

**TESIS DOCTORAL**

**ANA ESTHER KERGUELEN FUENTES**



**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA  
CARGA MUTACIONAL DE JAK2V617F EN  
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS  
CRÓNICAS Ph NEGATIVAS CLÁSICAS.**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**2012**

**TESIS DOCTORAL**

# **UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA MUTACIONAL DE JAK2V617F EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS Ph NEGATIVAS CLÁSICAS.**

**Doctoranda: Ana Esther KERGUELEN FUENTES**  
**Universidad Autónoma de Madrid.**

## **DIRECTORES**

**Dr. Francisco ARNALICH FERNÁNDEZ**  
**Dr. Luis LOMBARDIA FERREIRA**

# AGRADECIMIENTOS

A los pacientes, que cada día me convierten en mejor persona.

Después de este trabajo me he dado cuenta de que los objetivos se marcan y con esfuerzo e ilusión se alcanzan, pero una reflexión aún más importante ha sido darme cuenta de lo importante que es tener maestros ejemplares y confianza en uno mismo. En este sentido, no olvido lo trascendental que han sido para mí los propios pacientes que me han enseñado a seguir en la lucha de cada día.

A Ana Rodríguez de la Rúa, José Martínez y a Dolores Hernández que me han enseñado a “aterrizar”, y darme tiempo para reflexionar y disfrutar del trabajo diario, y lo más importante “de la vida”.

A Luis Lombardía, por su nobleza, paciencia y ayuda constante.

A Francisco Arnalich, con quien ha sido un orgullo llevar a cabo este trabajo y cuyo enfoque ha sido fundamental para un resultado óptimo.

Al equipo médico de Jordi Sierra de los que aprendí un rigor profesional y las ventajas de un trabajo en equipo.

A Miguel Angel Canales y el servicio de Hematología con los que paso buenos y malos momentos, pero siempre irrepetibles.

A lo mejor que tengo, mi familia.

Por último y sin embargo el primero a Daniel Salván.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE .....	v
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION.....	1
<b>1.-NMPc Ph (-).....</b>	<b>2</b>
1.1.-Concepto .....	2
1.2.-Etiopatogenia.....	6
1.3.-Clínica .....	7
1.3.1.1.-Complicaciones cardiovasculares .....	7
a.-Trombosis.....	7
a.1.-Alteraciones de la microcirculación.....	7
a.2.-Trombosis arterial .....	8
a.3.-Trombosis venosa .....	9
a.4.-Pronostico y riesgo de trombosis .....	10
a.5.-Mecanismos clásicos patogénicos de trombofilia en PV y TE .....	13
a.5.1.-Eritrocitosis y anormalidades en las células rojas .....	13
a.5.2.-Trombocitosis .....	14
a.5.3.-Anormalidades funcionales de las plaquetas .....	14
a.5.4.-Leucocitos.....	15
b.-Hemorragias. ....	18
1.3.1.2.-Progresion de TE a PV .....	19
1.3.1.3.-Progresión a mielofibrosis/LAM .....	20
a.-Progresión a mielofibrosis en Policitemia Vera .....	20
b.- Progresión a mielofibrosis en Trombocitemia esencial .....	23
c.-Transformación leucémica .....	24
<b>2.-JAK2 .....</b>	<b>26</b>
2.1.-Antecedentes de las proteínas quinasas y JAK2 .....	26
2.2.-La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis, inmunomodulación y desarrollo .....	27
2.3.-Mutaciones de JAK2 .....	32
2.3.1.-La mutación V617F .....	33
2.3.2.-Más allá de JAK2 V617F: mecanismos alternativos de la patogénesis de las NMPC. ....	34
2.3.2.1.-Mutaciones del exón 12.....	35
2.3.2.2.- Mutaciones en MPL .....	37
<b>3.-JAK2 y NMPC Ph(-) .....</b>	<b>39</b>
3.1.-Clasificación diagnóstica de las NMPC. ....	39
3.1.1.-Trombocitemia Esencial vs Policitemia Vera. ....	45
3.1.2.-Trombocitemia Esencial vs Mielofibrosis Primaria.....	51
3.1.3.-Diagnóstico de PV. ....	53

3.1.4.-Diagnóstico de mielofibrosis. ....	57
3.2.- Pronóstico (estratificación). ....	60
3.2.1.-Policitemia Vera y Trombocitemia esencial. ....	60
3.2.2.-Mielofibrosis (estratificación).....	60
3.2.3.-Importancia de la carga alélica en el pronóstico. ....	65
3.3.-Tratamiento .....	67
3.4.1.- Indicaciones de inicio de tratamiento citorreductor en TE. ....	68
3.4.2.-Elección del agente citorreductor.....	71
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>78</b>
<b>1. Muestras y características de los pacientes.....</b>	<b>79</b>
<b>2. Análisis de la carga alélica. ....</b>	<b>80</b>
<b>3. Análisis estadísticos.....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>87</b>
<b>1.- Carga alélica de JAK2 (V617F) y fenotipo clínico.....</b>	<b>90</b>
1.1.-Análisis univariante.....	90
1.2.-Análisis multivariante. ....	93
<b>2.-Carga alélica de JAK 2 (V617F) y complicaciones vasculares. ....</b>	<b>94</b>
2.1.-Análisis univariante.....	94
2.2.-Análisis multivariante. ....	95
<b>3.-Carga alélica y transformación de la enfermedad.....</b>	<b>95</b>
3.1.- Transformación a mielofibrosis. ....	96
3.2.-Transformación a leucemia aguda mieloide.....	96
<b>4.-Carga alélica y supervivencia. ....</b>	<b>96</b>
<b>5.-Seguimiento de la carga alélica.....</b>	<b>97</b>
5.1.-Policitemia Vera.....	98
5.2.-Trombocitemia Esencial.....	98
5.3.-Mielofibrosis Primaria. ....	99
<b>DISCUSION.....</b>	<b>101</b>
<b>1.-Resumen de los estudios publicados sobre la mutación V617F en el gen JAK2 y NMPC .....</b>	<b>104</b>
<b>2.-Las consecuencias funcionales de mutaciones en JAK2 en NMPC.....</b>	<b>107</b>
<b>3.-La carga alélica JAK2V617F .....</b>	<b>108</b>
3.1.-Asociación carga alélica JAK2V617F con el fenotipo clínico y el diagnóstico de TE y PV. ....	109
3.2.-Impacto de la mutación V617F en el diagnóstico de PV .....	110
3.3.-Impacto de mutación JAK2V617F en el diagnóstico de TE y MF .....	113
3.4.-Asociación de JAK2V617F con complicaciones trombóticas-hemorrágicas .....	115
3.5.-Asociación JAK2V617F con progresión/ transformación de NMPC .....	117
3.5.1.-Progresión/Transformación en TE.....	118
3.5.2.-Progresión/Transformación en PV.....	118
3.5.3.-Progresión/Transformación en Mielofibrosis .....	120
3.5.3.1.-Transformación leucémica en las NMPC (Ph-).....	120
3.5.3.2.-Relacion de la transformación leucémica con el tratamiento. ....	122
3.6.- Asociación de JAK2V617F con la supervivencia en NMPC.....	125
3.7.-Elección del agente citorreductor y estado mutacional JAK2 V617F.....	126

3.8.- Inhibidores de JAK: su valor y sus limitaciones .....	127
3.8.1.-Inhibidores JAK2 en PV/TE .....	127
3.8.2.-Inhibidores de JAK2 en la Mielofibrosis .....	128
3.9.-Otros fármacos .....	133
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>139</b>

# RESUMEN



**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** La identificación de la mutación V617F en el exón 14 del gen JAK2 en pacientes diagnosticados de Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas (NMPC) es fundamental en el *cribado* diagnóstico. Nuestro objetivo fue investigar la asociación entre la cuantificación de la mutación V617F (carga alélica JAK2V617F) y el fenotipo clínico al diagnóstico, y definir el papel de la carga alélica en la predicción de complicaciones. **MATERIAL Y MÉTODO:** En el servicio de Hematología del Hospital Universitario “La Paz” realizamos un estudio observacional retrospectivo (2005- 2012) en 204 pacientes diagnosticados de NMPC y análisis de detección de la mutación JAK2(V617F) (JAK2<sup>mut</sup>): 52 policitemias vera (PV), 142 trombocitemias esenciales (TE) y 10 mielofibrosis primarias (MFP). El porcentaje de alelos mutados fue evaluado en polimorfonucleares de sangre periférica mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR). En función de si la carga tumoral se encuentra entre 1-50% o es >50% los pacientes fueron diagnosticados de JAK2mut heterocigoto o homocigoto, respectivamente. **RESULTADOS:** Se realizó el estudio cuantitativo por QRT-PCR en los 204 pacientes incluidos en el estudio, detectando la mutación JAK2V617F en 130 casos y siendo negativa para los 74 pacientes restantes. Encontramos que la presencia de mutación se asocia con la trombosis, y especialmente con la trombosis arterial. Además y en la serie completa, la carga alélica homocigótica se asocia con diagnóstico de PV, edad avanzada, leucocitosis, mayor hematopoyesis y esplenomegalia. **CONCLUSIONES:** De acuerdo con nuestros resultados la detección de la mutación JAK2(V617F) está asociada a una mayor incidencia de trombosis, leucocitosis y esplenomegalia. Su identificación nos permitiría una mejor estratificación pronóstica de los pacientes diagnosticados de NMPC.

# INTRODUCCION

## 1.-NMPc Ph (-)

### 1.1.-Concepto

El sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce para los tumores hematopoyéticos 5 categorías de neoplasias mieloides. Estas categorías son: leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), neoplasias mieloproliferativas (NMP), síndrome mielodisplásico/neoplasias mieloproliferativas (SMD / NMP), y neoplasias mieloides / linfoides con eosinofilia y reordenamiento (PDGFR/FGFR1) ([1]) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de tumores malignos mieloides y subcategorización operativa de neoplasias mieloproliferativas. (Traducido de Tefferi A., 2011).**

<b>1) Leucemia mieloide aguda y neoplasias precursoras relacionadas.</b>
<b>2) Síndromes mielodisplásicos (SMD).</b>
<b>3) Neoplasias mieloproliferativas (NMP).</b>
<b>a) NPM Clásicas.</b>
<b>i) Leucemia mieloide crónica (LMC), BCR-ABL1 positivo.</b>
<b>ii) Policitemia vera (PV)</b>
<b>(1) PV en fase crónica.</b>
<b>(2) Mielofibrosis (MF) post-PV.</b>
<b>(3) PV en fase blástica.</b>
<b>iii) Trombocitemia esencial (TE).</b>
<b>(1) TE en fase crónica.</b>
<b>(2) MF post-TE.</b>
<b>(3) TE en fase blástica.</b>
<b>iv) Mielofibrosis primaria (MFP).</b>
<b>(1) MFP en fase crónica</b>
<b>(2) MFP en fase blástica.</b>
<b>b) NMP no-clásicas.</b>
<b>i) Leucemia neutrofílica crónica.</b>
<b>ii) Leucemia eosinofílica crónica (no especificada).</b>
<b>iii) Mastocitosis</b>
<b>iv) Neoplasia mieloproliferativa inclasificable (NMP-U)</b>
<b>4) SMD / NMP.</b>
<b>5) Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y anormalidades de PDGFRA*, PDGFRB * o FGFR1*.</b>

\* Reordenamientos genéticos que involucran los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA / PDGFRB) o el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1).

Además, la OMS incluye ocho entidades clínico-patológicas en la categoría de neoplasias mieloproliferativas crónicas (MPNC): la leucemia mieloide crónica (LMC), la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE), la mielofibrosis primaria (MFP), la leucemia crónica neutrofílica, leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis y NMPC no clasificables. Bajo el término de mielofibrosis (MF) se incluye la mielofibrosis primaria (MFP), y la secundaria a Policitemia vera (MF Post-PV) o a la trombocitemia esencial (MF post-TE)[1]. Por tanto no engloba la fibrosis de la médula ósea que puede acompañar a otras enfermedades hematológicas como el síndrome mielodisplásico y no hematológicas como metástasis de neoplasias sólidas, enfermedades autoinmunes [2], endocrinopatías, hipertensión pulmonar etc. Además no es infrecuente en el contexto de infecciones (por ejemplo, el sida, la leishmaniosis), y tras la exposición a sustancias tóxicas. Además, dado nuestro conocimiento actual sobre la naturaleza clonal de MF, no es correcto seguir utilizando términos alternativos como "Metaplasia mieloide agnogénica " o " mielofibrosis crónica idiopática" [3].

La MFP-PV-ET fueron descritos por primera vez en 1879 (Heuck), 1892 (Vázquez) y 1934 (Epstein) respectivamente, y su estrecha relación fue oficialmente reconocida en 1951 y molecularmente validada en 2005. En 1951 William Dameshek denominó a las cuatro primeras (LMC, PV, TE y MFP) [4] "síndromes mieloproliferativos", que son las actuales neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC) según la clasificación de la OMS 2008 [5, 6]. Como la LMC está asociada de forma invariable y específica a la detección del transcrito BCR-ABL [5] las otras tres (PV, TE y PMF) han pasado a denominarse NMPC *BCR-ABL* negativas. La MF post-PV y post-TE se clasifican y se diagnostican de acuerdo a los criterios de consenso establecidos por "*The International Working Group for MPN Research and Treatment*" (IWG-MRT) [7]. La incidencia total estimado de las tres entidades clásicas de NMPC *BCR-ABL* negativas (PV, TE y MFP)

es de cinco de cada 100.000 personas, o aproximadamente 15.000 nuevos casos cada año en los EE.UU [8, 9]. El origen de las NMPC BCR-ABL negativas (PV, TE y PMF) se ha tradicionalmente considerado una alteración clonal de la madre hematopoyética [4, 10-12] sin embargo los crecientes estudios familiares y análisis de haplotipos en la línea germinal [4] sugiere un componente hereditario y una posible susceptibilidad génica que predispone al desarrollo de NMPC [13-19]. La morbimortalidad de estas enfermedades está asociada a la aparición de trombosis y sangrado, y en los pacientes con PV (y, en menor medida, los pacientes con ET) con el riesgo de transformación en mielofibrosis. Además, los tres trastornos presentan aunque en distinta medida (MFP o MFS>PV>TE) un riesgo de transformación a leucemia aguda. A pesar de su heterogeneidad clínica y biológica, NMPC también pueden presentar mimetismo fenotípico, por lo tanto, el diagnóstico de una entidad específica de NMPC depende de una combinación de hallazgos clínicos y de laboratorio, criterios histopatológicos y moleculares, definidos por la clasificación de la OMS 2008 [6]. Además, el descubrimiento de la mutación JAK2 V617F en 2005 destapó una vía común de la activación constitutiva de las tirosina quinasas en NMPC, y ha promovido una avalancha de información adicional sobre la genética de estas enfermedades. Este hallazgo ha tenido implicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas. Al descubrimiento de la mutación V617F en el exón 14 del gen JAK2, se ha añadido en los últimos 5 años, un gran número de mutaciones [20] como *MPL*, *LNK*, *CBL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH*, *IKZF1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TP53*, o mutaciones *SF3B1* [1], [4] (Tabla 2) tanto en la fase crónica como en la fase acelerada de la enfermedad. A diferencia de en la LMC, las NMPC BCR-ABL negativas son enfermedades más complejas de lo que se creía, y sus “marcas” moleculares (JAK2V617F, mutaciones en el exón 12, mutaciones en *MPL*...) no parecen ser análogas a BCR-ABL en términos de

importancia y diana terapéutica.[21, 22]. Se ha descrito que la eritrocitosis clonal requiere de la presencia de una mutación en JAK2 (JAK2V617F o mutación en el exón 12) [23] o de sus reguladores negativos como LNK[24]. Del mismo modo, parece que hay una estrecha relación entre las mutaciones SF3B1 y la presencia de sideroblastos en anillo en la médula ósea en las NMPC [23] Además recientemente adquiere importancia la hipótesis de una posible coexistencia de múltiples clones anormales e independientes, lo que convierte a estas enfermedades en un mayor desafío diagnóstico y terapéutico [25-31].

Tabla 2. Mutaciones en PV, TE, MFP y NMP en fase acelerada (traducido de Tefferi A., 2010)

<i>Mutaciones</i>	<i>Localización en cromosoma</i>	<i>Frecuencia mutacional.</i>	<i>Relevancia patogénica</i>
JAK2V617F (exón 14)	9p24	PV~96%	Contribuiría al trastorno mieloproliferativo y a la hipersensibilidad del factor de crecimiento de células progenitoras.
		TE~55%	
		MFP~65%	
		NMPC fase acelerada ~50%	
Exon 12 de JAK2 ( <i>Janus Kinase 2</i> )	9p24	PV~3%	Contribuiría al trastorno mieloproliferativo eritroide primario.
		TE~raro	
		MFP~raro	
		NMPC fase acelerada ~?	
Exón 10 de MPL ( <i>Myeloproliferative Leukemia Virus oncogene</i> ) (codifica el receptor de la trombopoyetina).	1p34	PV~raro	Contribuiría al trastorno mieloproliferativo megacariocítico primario.
		TE~3%	
		MFP~10%	
		NMPC fase acelerada ~?	
Las mutaciones en <i>TET2</i> ( <i>TET oncogene family member 2</i> ) ocurren a través de varios de los 12 exones del gen.	4q24	PV~16%	Podría contribuir a la modulación epigenética de la transcripción ( <i>TET1</i> cataliza la conversión de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina).
		TE~5%	
		MFP~17%	
		NMPC fase acelerada ~17%	
Exon 12 de <i>ASXL1</i> ( <i>Additional Sex Combs-Like 1</i> )	20q11.1	PV~?	Afectaría la regulación de la transcripción y la señalización mediada por <i>RAR</i> ( <i>Retinoic Acid Receptor</i> ).
		TE~?	
		MFP~?	
		NMPC fase acelerada ~19%	
Exones 8 y 9 de <i>CBL</i> ( <i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i> ).	11q23.3	PV~raro	Alteraría la función de regulación del gen <i>CBL</i> <i>nativo</i> contrarrestando la señalización por quinasas debido a la ubiquitinación defectuosa de oncoproteínas.
		TE~raro	
		MFP~6%	
		NMPC fase acelerada ~?	
Exones 4 de <i>IDH1</i> y <i>IDH2</i> ( <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> y <i>2</i> )	2q33.3/15q26.1	PV~raro	Induce la acumulación de 2-hidroxiglutarato, una potencial oncoproteína .
		TE~raro	
		MFP~4%	
		NMPC fase acelerada ~20%	
<i>IKZF1</i> ( <i>IKAROS family zinc finger 1</i> )	7p12	PV~raro	Alteraría la actividad supresora de tumores de la proteína de tipo salvaje.
		TE~raro	
		MFP~raro	
		NMPC fase acelerada ~19%	

### 1.2.-Etiopatogenia

Uno de los más importantes avances en las NMPC se llevó a cabo en 1974, cuando se demostró que las muestras de la médula ósea de pacientes diagnosticados de PV, comparado con un grupo control de voluntarios sanos, producen colonias eritroides in vitro de una manera independiente de la estimulación por citoquinas. El hecho de que no sólo todos los pacientes con PV, sino también la mitad de los diagnosticados de TE [32] o MFP [33], producen colonias eritroides endógenas, consolidó además la idea de interconexión entre estos trastornos. La confirmación de la naturaleza clonal de NMPC fue proporcionado por primera vez en 1976, cuando se demostró que una sola isoforma de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa está presente tanto en los eritrocitos, como en granulocitos y plaquetas en muestras obtenidas de pacientes con PV, demostrando así la expansión clonal de una célula progenitora hematopoyética multipotente [10] (Tabla 3). Estas observaciones fueron posteriormente confirmados por técnicas de biología molecular como el análisis por PCR y se extendió a pacientes con TE y MFP en los años 90 [34, 35]. El nexo que une PV, TE y PMF ha sido debidamente comprobado en los últimos años con el descubrimiento de una mutación somática recurrente en el gen *JAK2*, una anomalía que es compartida por una gran proporción de pacientes con NMPC y de la que describiremos detalladamente en los apartados siguientes.

Tabla 3 Secuencia histórica de las principales aportaciones científicas en la PV.

Autor	Año	Hallazgo
Vázquez	1892	Primer paciente catalogado de PV
Damesheck	1951	Concepto de SMPc
Prchal	1974	Crecimiento endógeno de colonias eritroides
Adamson	1976	Hematopoyesis clonal
Kralovics	2002	Pérdida de heterogosisidad 9p
Baxter, James, Levine, Zhao y Kralovics	2005	Mutación V617F en gen JAK2
Scott	2007	Mutaciones en el exón 12 del gen JAK2

### 1.3.-Clínica

La clínica común a todas las NMPC Ph(-) es: 1.-Tendencia a la trombosis; 2.-Tendencia a la hemorragia; 3.-Tendencia a la transformación a leucemia aguda; y 4.-Ocasional evolución de una entidad en otra (TE y PV a MF o TE a PV).

#### 1.3.1.1.-Complicaciones cardiovasculares

##### a.-Trombosis

La trombosis de las grandes arterias es la principal causa de mortalidad en pacientes diagnosticados de TE y pueden inducir graves manifestaciones neurológicas, cardíacas o de la circulación periférica. Del mismo modo la trombosis venosa profunda o la trombosis portal [36] pueden desencadenar una embolia pulmonar o insuficiencia hepática (Budd Chiari) grave, respectivamente.

##### a.1.-Alteraciones de la microcirculación

La mayoría de las manifestaciones clínicas son eritromelalgia, alteraciones visuales y auditivas, fenómeno de Raynaud e intratable dolor de cabeza. Uno de los más



característicos es la eritromelalgia, con buena respuesta clínica al tratamiento con aspirina. Los pacientes lo describen como sensación de quemazón en los dedos de manos y pies. A menudo se acompaña por una extremidad caliente, roja o violeta, y en fases avanzadas hacia pequeñas zonas de necrosis o incluso gangrena periférica si progresa a arterias de mayor calibre. Aunque por lo general afectan a los sujetos con TE y PV también puede manifestarse en pacientes con síndrome mielodisplásico o con otras enfermedades no hematológicas [37]. La eritromelalgia, sin embargo, nunca ocurre en la trombocitosis secundaria, lo que confirma que las anomalías cualitativas plaquetarias tienen una función importante en la patogénesis de este fenómeno. La fisiopatología de los dolores de cabeza se mantiene incierta, aunque a veces, los síntomas neurológicos en TE muestran una sorprendente similitud con migraña con aura. En estos casos el dolor de cabeza se acompaña de inestabilidad transitoria y escotomas brillantes. Síntomas focales, como disartria, ceguera monocular transitoria o mono o hemiparesia son menos comunes [37]. La disfunción visual también se puede manifestar en forma de diplopía transitoria y ataques bruscos de visión borrosa. Todos estos síntomas específicos desaparecen con agentes antiagregantes y se producen, al menos en pacientes jóvenes, en ausencia de notables lesiones ateromatosas en el sistema arterial.

### **a.2.-Trombosis arterial**

Muchos estudios han demostrado (Tabla 4) [37], que la trombosis arterial al diagnóstico es muy común, tanto en pacientes diagnosticados de PV como TE, y una aparente reducción del riesgo de trombosis durante el seguimiento.

Tabla 4: Trombosis al diagnóstico en sujetos diagnosticados de TE y PV (Traducido de Landolfi *et al.*, 2008).

	Nº de pacientes	Trombosis mayores % de pacientes	Arterial % de pacientes	Venosa
<b>Policitemia vera</b>				
<b>GISP.</b> <sup>[38]</sup>	1213	34	66	33
<b>Passamonti <i>et al.</i></b> <sup>[39]</sup>	163	34	64	36
<b>Marchioli <i>et al.</i></b> <sup>[40]</sup>	1638	38.6	75	25
<b>Gangat <i>et al.</i></b> <sup>[41]</sup>	459	22	64	42
<b>Trombocitemia esencial</b>				
<b>Chim <i>et al.</i></b> <sup>[42]</sup>	231	13	96.7	3.3
<b>Besses <i>et al.</i></b> <sup>[43]</sup>	148	25	ND	ND
<b>Wolanskyj <i>et al.</i></b> <sup>[44]</sup>	322	26.3	ND	ND
<b>Jensen.</b> <sup>[45]</sup>	96	14	85	15
<b>Campbell <i>et al.</i></b> <sup>[46]</sup>	776	9.7	82.7	7.3
<b>Carobbio <i>et al.</i></b> <sup>[47]</sup>	439	29.4	68.2	31.8

ND: No Disponible

La trombosis de grandes arterias con frecuencia involucra a los vasos cerebrales o arterias coronarias. El accidente cerebrovascular isquémico es una causa frecuente de muerte en los sujetos diagnosticados de PV que no están con tratamiento, y aún constituye el 30-40% de todos los eventos trombóticos en los pacientes diagnosticados de PV [40]. Por el contrario, los síndromes coronarios agudos son más raros, sobre todo durante el seguimiento y más aún si son pacientes tratados.

### a.3.-Trombosis venosa

La trombosis venosa en los pacientes diagnosticados de PV y ET por lo general se manifiesta con una mayor incidencia de trombosis venosa profunda en las extremidades inferiores, y puede causar embolia pulmonar. La tromboflebitis superficial es común, así como la trombosis venosa en sitios poco frecuentes en la población general (Figura 1) [37].

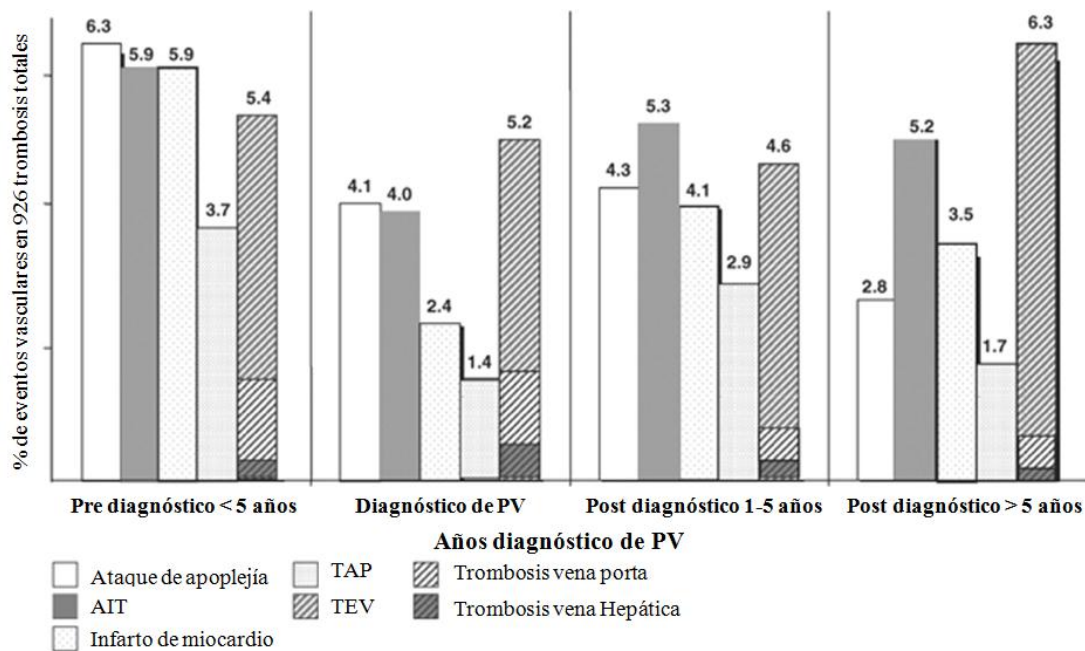


Figura 1. Eventos trombóticos registrados en la cohorte ECLAP (721 trombosis previas y 205 eventos registrados durante el seguimiento de 1638 pacientes con PV). La gráfica muestra los distintos tipos de eventos trombóticos como porcentaje de los eventos totales a varios tiempos del seguimiento: antes y en el momento del diagnóstico y en etapas posteriores de la enfermedad. TAP, trombosis arterial periférica; PV, policitemia vera; AIT: accidente isquémico transitorio, TEV, tromboembolismo venoso. (Traducido de Landolfi *et al.*, 2008).

En la PV, las trombosis venosas son relativamente frecuentes y constituyen aproximadamente un tercio del total de trombosis [40]. Se han descrito en pacientes mujeres jóvenes trombosis de los senos cerebrales y del territorio esplácnico (portal y hepática) y en ocasiones antes del diagnóstico. Se estima que entre el 40 y el 60% de los casos [48] en los que se diagnostica una trombosis de la vena portal hepática existe una NMPC latente. Por lo tanto, en todos los sujetos diagnosticados de trombosis del territorio esplácnico debe ser descartado una NMPC oculto. Se considera como posibles causas que justifican la trombosis del territorio esplácnico, el aumento del flujo sanguíneo portal, la esplenomegalia congestiva y hematopoyesis extramedular hepática.

## a.4.-Pronostico y riesgo de trombosis

De acuerdo con estudios previos [49, 50], no hay diferencias sustanciales en la esperanza de vida de 247 pacientes diagnosticados de TE, de acuerdo con los criterios PVSG (*Policitemia Vera Study Group*) y la población general. Sin embargo, la consideración de que la TE es la más bien benigna de NMPC, que afecta más a la calidad de vida que a la esperanza de vida, ha sido cuestionada por recientes publicaciones [51]. En este sentido es muy importante la discriminación de MFP ya sea en fase prefibrótica (score 0) o fibrosis temprana (score 1) de la ET, según clasificación de la OMS, dado que se ha demostrado un acortamiento de la esperanza de vida de 32,3% y 21,6% para los primeros dos subgrupos en comparación con sólo el 8,9% para los pacientes diagnosticados de TE [51]. Bazzan y colaboradores estudiaron 187 pacientes diagnosticados de ET de la misma edad y saludables, comparándolos con las personas que viven en la misma zona durante un período de seguimiento de 15 años [52]. Este estudio demostró una mayor tasa de mortalidad significativa y una menor supervivencia libre de trombosis en pacientes menores de 55 años. Por el contrario, en un grupo de 74 mujeres menores de 50 años al momento del diagnóstico diagnosticadas de TE, la supervivencia global fue similar a las del grupo control de población, con una baja incidencia de las complicaciones trombo-hemorrágicas potencialmente mortales o leucemia aguda, pero un aumento en la incidencia de abortos involuntarios en el primer trimestre [53]. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, que sugieren estas discrepancias en el pronóstico, los esfuerzos van dirigidos a comprender el riesgo de complicaciones en pacientes con ET, así como los factores de riesgo implicados en la progresión clonal hacia PV, MFP, mielodisplasia y leucemia aguda.

El estudio Cortelazzo [54] en una cohorte de 100 pacientes con TE ha demostrado que el riesgo global de trombosis en pacientes diagnosticados de TE era igual 6,6% / año frente 1,2% / año en el grupo control. Tres importantes factores de riesgo fueron

identificados por este estudio. El riesgo de trombosis aumenta con la edad (1,7% pacientes / año antes de los 40 años; 6,3% de los pacientes / año entre 40 y 60 y 15,1% de los pacientes / años después de 60 años). Una historia previa de trombosis aumenta la incidencia de trombosis de 3,4 a 31,4% pacientes / año. Sin embargo, es más controvertida la relación directa entre riesgo de trombosis y el grado de elevación del número de plaquetas. Además, entre 10-20% de las complicaciones trombóticas graves se producen en los pacientes con TE, con un número de plaquetas por debajo de  $600 \times 10^9/L$  [55]. Un segundo estudio realizado por Cortelazzo y colaboradores demostraron que la reducción del número de plaquetas con hydrea en un grupo de 114 TE pacientes con un riesgo elevado de trombosis (mayores de 60 años o evento trombótico anterior) resultó en una significativa prevención de la trombosis o isquemia severa (accidente isquémico transitorio) [56].

Los factores asociados con mayor riesgo de complicaciones trombóticas en pacientes diagnosticados de TE son los siguientes:

- La presencia de trombofilia: en pacientes con TE hay un aumento del riesgo de tromboembolismo venoso en pacientes portadores del factor V de Leiden y en presencia de anticuerpos antifosfolípidos.
- Factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, el tabaquismo y la hipercolesterolemia han sido implicados en el mayor riesgo de trombosis en pacientes diagnosticados de TE, como lo demuestran estudios retrospectivos [43].
- El patrón de activación de plaquetas y granulocitos están todavía sujetos a investigaciones.

Otros factores como el patrón clonal de inactivación del cromosoma X [57], la reducción de la expresión de MPL en megacariocitos y en médula ósea sobre la

expresión del gen *PRVI* en los granulocitos de sangre periférica [58] (anteriormente incluido como criterios diagnóstico de NMPC) se asociaron con un mayor riesgo de trombosis.

### **a.5.-Mecanismos clásicos patogénicos de trombofilia en PV y TE**

#### *a.5.1.-Eritrocitosis y anormalidades en las células rojas*

En los pacientes diagnosticados de PV está demostrado el efecto protrombótico de un hematocrito elevado. En los pacientes diagnosticados de PV y que no han sido tratados, se describen con frecuencia ACV trombótico por ser la circulación cerebral particularmente sensible a la hiperviscosidad sanguínea. Los mecanismos por los que la hiperviscosidad aumenta el riesgo de trombosis son múltiples, pero es importante destacar que el aumento del hematocrito desplaza las plaquetas a la pared del vaso, por lo tanto facilita su activación y posibilita la interacción plaqueta-plaqueta. El tratamiento de la hiperviscosidad sanguínea es esencial, pero no elimina totalmente la activación de las plaquetas en vivo y el aumento de riesgo de trombosis en pacientes diagnosticados de PV [59]. En los pacientes diagnosticados de Trombocitemia esencial, a pesar de la normalidad de los valores de hematocrito, el riesgo trombótico es similar a los pacientes diagnosticados de PV. En ambas NMPC, también hay anomalías en leucocitos que incluyen cambios bioquímicos en la membrana y contenido celular. Estos cambios pueden afectar de forma independiente al flujo sanguíneo a través de la formación de agregados de glóbulos rojos que tienen la capacidad de bloquear directamente el flujo de sangre en los vasos pequeños, y por lo tanto contribuyen a la isquemia y el infarto, especialmente en el flujo sanguíneo cerebral. Por otra parte, la agregación de glóbulos rojos facilita la activación plaquetaria y la interacción de leucocitos con la pared de los vasos. Recientemente, se ha demostrado en hematíes de

pacientes diagnosticados de PV y del grupo sanguíneo Lutheran una fosforilación JAK2-dependiente, que es responsables de una mayor interacción de los hematíes con las células del endotelio [60]. Es probable que este fenómeno tenga una función en la patogénesis de las alteraciones de la microcirculación, en general, y en la diátesis trombótica de los sujetos diagnosticados de PV.

### *a.5.2.-Trombocitosis*

Es evidente que la trombocitosis puede contribuir a los eventos vasculares en pacientes diagnosticados de TE o PV, dado que la reducción en el número de plaquetas disminuye el riesgo de alteraciones de la microcirculación [37, 56]. La eficacia antitrombótica del tratamiento citorreductor en pacientes diagnosticados de TE de alto riesgo ha sido claramente demostrada [56]. Sin embargo, este hecho puede estar relacionado al menos parcialmente, con un efecto sobre el recuento de leucocitos y, posiblemente, con la activación de plaquetas y leucocitos. Por otro lado una trombocitosis marcada puede favorecer hemorragia en lugar de las manifestaciones trombóticas en pacientes diagnosticados de TE. Esta paradoja es atribuida a la posible aparición, en pacientes con trombocitosis, de un síndrome de von Willebrand adquirido, debido a un aumento en el aclaramiento en plasma de los grandes multímeros del factor von Willebrand [37].

### *a.5.3.-Anormalidades funcionales de las plaquetas*

Estudios in vitro han tratado de demostrar y caracterizar los posibles defectos plaquetarios en pacientes diagnosticados de NMPC con diátesis trombo-hemorrágica. Estos esfuerzos han conducido a la identificación de un gran número de anomalías morfológicas, funcionales y bioquímicas [61, 62]. La mayoría de los estudios funcionales de las plaquetas en pacientes diagnosticados de NMPC están basados en la medición de la agregación plaquetaria in vitro en respuesta a estímulos diversos. A

pesar de la limitación intrínseca de la técnica, las mediciones de agregación han proporcionado algunas conclusiones interesantes, como el fenómeno de la agregación espontánea [37] y la reducción de la respuesta de las plaquetas a algunos agentes de la agregación como colágeno difosfato de adenosina y epinefrina. Además se han descrito múltiples anomalías en las glicoproteínas de la membrana plaquetaria. Se ha observado una reducción de la expresión o función de los receptores Gp Ib y GP IIb-IIIa y un incremento en la expresión de la Gp IV. Además la medida del tiempo de sangrado tras procedimientos quirúrgicos o tras la administración del agente antiplaquetario está incrementado. Sin embargo pese a no tener las limitaciones de los estudios in vitro, la utilidad clínica del tiempo de sangrado en PV y TE ha sido limitada. En los pacientes diagnosticados de PV y TE se encontró que tenían una mayor tasa de excreción de metabolitos tromboxano A<sub>2</sub>, 11-dehidro-tromboxano B<sub>2</sub> y 2,3-dinor tromboxano B<sub>2</sub> en gran medida suprimible con dosis bajas de la aspirina y por lo tanto relacionados con la mejora de la producción de plaquetas en respuesta a los estímulos fisiológicos [59]. Sobre esta base, la alta excreción de metabolito Tx refleja in vivo la activación de plaquetas mediada por TX y constituye el fondo biológico para las pruebas de la relación beneficio / riesgo de dosis bajas de aspirina en el estudio ECLAP [63].

### *a.5.4.-Leucocitos*

Algunos estudios consideran que el aumento en el número de leucocitos es un factor de riesgo para trombosis en pacientes con PV y TE. Sin embargo, también se producen alteraciones cualitativas de los leucocitos, especialmente polimorfonucleares (PMN), que contribuyen a la activación del sistema hemostático (Figura 2) [37].



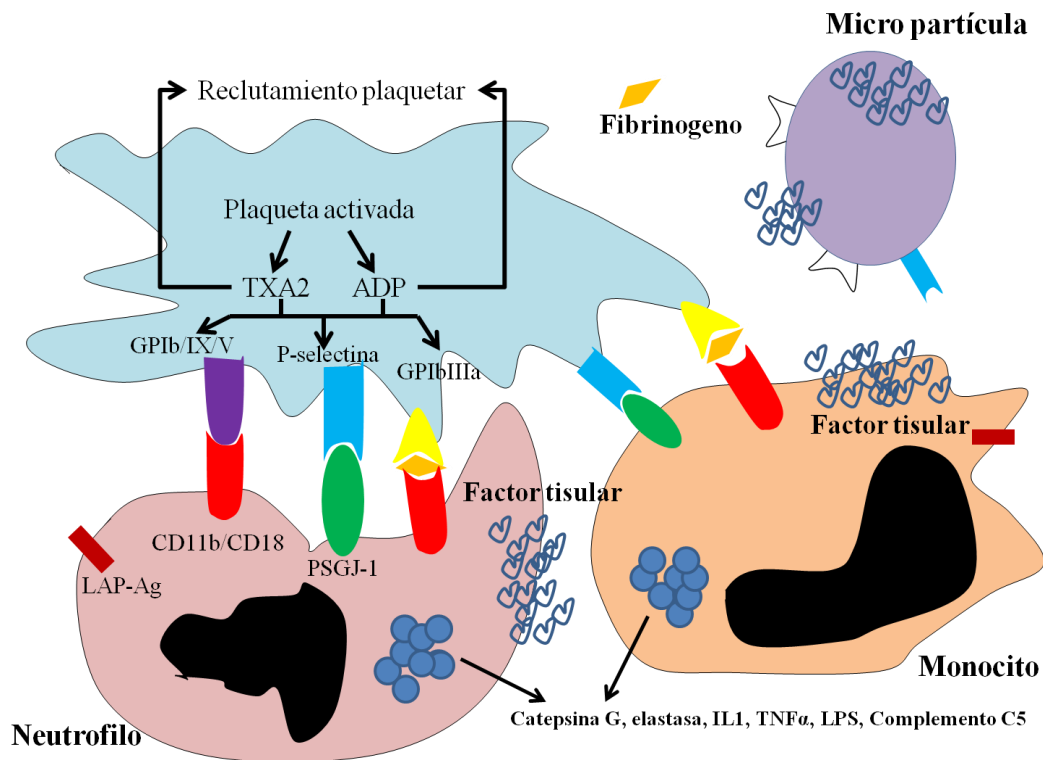


Figura 2 Mecanismos que promueven la interacción de plaquetas, neutrófilos y monocitos y la producción de sustancias protrombóticas. La figura muestra que la interacción de PMN con plaquetas está coordinado por una cascada de eventos en los que la P-selectina (CD62P) de las plaquetas se une a PSGL-1 en PMN. ADP, adenosina difosfato; GP, glicoproteína; IL, interleucina; LAP, fosfatasa alcalina leucocitaria; LPS, lipopolisacárido; TNF, factor de necrosis tumoral; TX, tromboxano. (Traducido de Landolfi *et al.*, 2008).

Los pacientes diagnosticados de PV o TE tienen una expresión significativamente mayor de la integrina B2, CD11b y de fosfatasa alcalina granulocitaria, y un importante aumento en el contenido celular de elastasa. Estos hallazgos, junto con el hallazgo de las concentraciones plasmáticas de elastasa y mieloperoxidasa, determinan una activación de PMN in vivo. Además, la correlación de las anomalías en PMN con un aumento en el plasma de los marcadores de la coagulación (es decir, la trombina antitrombina, fragmentos de protrombina y dímero D) y perturbación del endotelio (es decir, la trombomodulina y el factor de von Willebrand) apoya la hipótesis de una participación de los PMN en la patogénesis del síndrome de hipercoagulabilidad en los pacientes con TE y PV. El aumento de expresión de moléculas de la membrana de PMN (integrinas y

selectinas) aumenta la adhesión de los PMN a las células endoteliales y plaquetas. La interacción célula-célula estimula la expresión de características protrombóticas de las células endoteliales y plaquetas e induce la liberación por PMN de elastasa y catepsina G [64, 65]. Todos estos productos son capaces de afectar a un gran número de las funciones hemostáticas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) [37]. La interacción de PMN con las plaquetas es coordinado por una cascada de eventos en los que la P-selectina de las plaquetas (CD62P) se une a PSGL-1 de PMN). La interacción entre PMN activados y las plaquetas activadas genera agregados mixtos PMN / plaquetas, que son marcadores sensibles para la activación de las plaquetas, y se incrementan en varias condiciones patológicas asociadas con una propensión a la trombosis[66, 67]. Diversos estudios describen que los niveles más elevados de estos agregados en pacientes diagnosticados de TE y el PV se han atribuido en gran parte a este fenómeno a la activación plaquetaria. Sin embargo, los PMN de estos pacientes también expresan altos niveles de la integrina CD11b, que es un sitio importante para la unión de plaquetas. En un estudio realizado por Falanga *et al.* los agregados PMN/plaquetas circulantes miden simultáneamente los niveles de PMN activados y plaquetas activadas [68]. Los resultados de este estudio sugieren una función de PMN activados en la formación de un alto porcentaje de agregados mixtos que circulan en los pacientes diagnosticados de TE y PV. Esta interpretación fue apoyada por la evidencia de que *in vitro*, en las muestras de sangre la activación de PMN (sin activación de las plaquetas) resultó en un significativo aumento de la formación de agregados PMN-plaqueta. Vale la pena señalar que en los pacientes diagnosticados de TE que recibieron aspirina, el incremento de CD11b y agregados de PMN/plaquetas fue significativamente menor en comparación con los no tratados con aspirina.

### **b.-Hemorragias.**

Las hemorragias en la TE a menudo se limitan a hemorragias de índole cutánea y recurrente: contusiones, hematomas subcutáneos, equimosis, epistaxis o gingivorragia. Las petequias son infrecuentes. La historia de hemorragia gastrointestinal (melena y / o hematemesis) se puede evidenciar el momento del diagnóstico por pruebas biológicas como sangre oculta en heces. Pueden ocurrir sangrados graves secundarios a un trauma o cirugía. Las complicaciones hemorrágicas rara vez se producen en el curso de la enfermedad cuando se toman las medidas preventivas. Las hemorragias principalmente se observan en pacientes con mayor recuento plaquetario [36]. La diátesis hemorrágica no es debido al deterioro de la función plaquetaria, sino más bien a una enfermedad von Willebrand adquirida. Existe una relación inversa entre los niveles de FvW y el recuento de plaquetas. La deficiencia de grandes multímeros FvW aparece en cuanto el recuento de plaquetas aumenta de  $1000$  a  $1500 \times 10^9 / L$ . La aspirina puede enmascarar una diátesis hemorragia latente y puede resultar en severas complicaciones hemorrágicas. Por lo tanto, está contraindicado en pacientes con historia de hemorragia y un recuento de plaquetas muy elevado. Si está indicado, la aspirina debe ser utilizada en dosis baja (100 mg al día).

Estudios previos han demostrado un riesgo de hemorragia mayor en pacientes diagnosticados de TE de 0,33% / año [36]. Como ya se ha mencionado previamente, las hemorragias severas son más frecuentes en pacientes con recuento de plaquetas  $>1500 \times 10^9 / L$ , pero el riesgo disminuye cuando el número de plaquetas se reduce por el tratamiento, permitiendo el uso de dosis bajas de aspirina asociada a citorreducción en estos pacientes [69]. En el estudio ECLAP se demostró que los pacientes diagnosticados

de PV, una historia previa de hemorragia fue un importante predictor de hemorragia recurrente [69]. Recientemente, se ha propuesto una categorización preliminar:

A) alto riesgo: en los pacientes con el número de plaquetas  $>1500 \times 10^9$ , antecedentes de sangrado mayor o presencia de los tres siguientes factores de riesgo menores.

Factores de riesgo menores propuestos son:

- Enfermedad de duración de más de 15 años.
- El recuento de plaquetas  $> 1000 \times 10^9$  /L.
- Historia de hemorragia leve.

B) Riesgo Intermedio: cuando los pacientes tienen dos factores de riesgo menor

C) Bajo riesgo: no cumplen las condiciones anteriores.

### **1.3.1.2.-Progresion de TE a PV**

En los pacientes diagnosticados de TE, un aumento de los niveles de Hb y hematocrito hacia valores similares a los observados en pacientes diagnosticados de eritrocitosis primaria o incluso una franca progresión a PV (de acuerdo con los criterios de la OMS) se ha observado hasta en 5 a 6,5% de las grandes series de pacientes [70]. Los criterios utilizados para el diagnóstico diferencial entre TE y PV probablemente puedan explicar algunas de estas progresiones incipientes de una entidad en otra. La presencia de colonias eritroides aumentas en la médula ósea, masa eritroide aumentada, niveles altos de transcritos *PRV-1* en los granulocitos y niveles bajos circulantes de EPO en pacientes con TE, indican una interconexión entre la PV y un subconjunto de los pacientes con TE [58, 71]. Con la incorporación del estudio de detección de mutaciones en JAK2 y la carga alélica se ha podido definir mejor el riesgo de progresión a PV, como veremos en apartados posteriores.

### **1.3.1.3.-Progresión a mielofibrosis/LAM**

#### **a.-Progresión a mielofibrosis en Policitemia Vera**

La MF Post-PV es más frecuente que la MF post-TE pero es un evento tardío en el curso de la enfermedad. El riesgo a los 15 años de la evolución de la mielofibrosis en los pacientes diagnosticados de PV se estima en el 6% y la incidencia es de 5,1 /1000 personas-año [49]. La mielofibrosis secundaria a PV no es una enfermedad en sí misma sino una reacción del estroma de la médula a las citocinas liberadas por clona de las células proliferantes en pacientes diagnosticados de PV [70]. Este hecho determina que se produzca fibrosis reticulínica y colágena, osteosclerosis y neoangiogenesis [72]. Las manifestaciones clínicas incluyen las mismas que en la mielofibrosis primaria, anemia progresiva, esplenomegalia masiva, afectación ósea [73], así como hematopoyesis extramedular no hepatoesplénica [74]. No se han identificado los factores de predicción del riesgo de MFS de acuerdo con los criterios PVSG. Sin embargo de acuerdo con la clasificación de la OMS y en función de los resultados de las biopsias realizadas en el seguimiento, el riesgo de progresión a fibrosis se ha estimado en un 50% después de una mediana de seguimiento de 38 +/- 3 meses en los pacientes con fibrosis medular (score 0 y 1) al diagnóstico [75]. El grado de displasia megacariocítica y el nivel de la hiperplasia de granulocitos son características importantes y tienen su papel en el riesgo de progresión de la fibrosis. Hemos de destacar un estudio en el que se evaluaron 68 pacientes que desarrollaron MF post-PV de acuerdo con los criterios de GTI-MRT (*International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*) en una cohorte de 647 pacientes diagnosticados de PV [76]. En este estudio se analizaron los factores de riesgo que pueden predecir la transformación MF post-PV, y se demostró que la presencia de leucocitosis moderada al diagnóstico (recuento de glóbulos blancos

$>15 \times 10^9/L$ ) se correlaciona significativamente con la presencia de MF post-PV. La movilización de las células CD34 en sangre periférica representa un fenómeno frecuente en la MF post-PV [77, 78] y todos los pacientes evaluados en el primer estudio tenían alto recuento de células CD34 circulantes [76]. Los niveles séricos de LDH se ha introducido recientemente en los criterios de la OMS para diagnosticar MFP [7]. Todos los pacientes en esta serie tenían altos niveles séricos de LDH, destacando la utilidad clínica de este parámetro en estos pacientes [76].

En cuanto a complicaciones de la enfermedad de los pacientes con MF post-PV, este estudio muestra que la trombosis sigue siendo también una complicación frecuente en los pacientes con PV después de la transición a la mielofibrosis. Aún es controvertido si el desarrollo de MF post-PV influye en la supervivencia [79], aunque los datos de estudios previos indican un empeoramiento de la tasa de supervivencia global en los pacientes con PV después de la transformación a fibrosis [76]. En este estudio, la mediana de supervivencia de los pacientes con MF post-PV fue de 5,7 años, ligeramente inferior a la reportada en un estudio incluyendo pacientes con MF post-PV y la MF post-TE [80]. Para estratificar mejor a los pacientes, se realizó un estudio de factores de riesgo al momento del diagnóstico predictivos de supervivencia de la MF post-PV. El uso de un multivariado de regresión de riesgos proporcionales de Cox, encontró que un nivel de hemoglobina inferior a 100 g/L (10g/dl) es un factor de riesgo independiente para la supervivencia. De hecho, los pacientes con valores de hemoglobina de 100 g/L (10 g/dL) o más tenían una supervivencia media de 6,6 años, mientras que aquellos con un valor de hemoglobina inferior a 100 g/L (10 g/dl) tuvieron una supervivencia media de 1,9 años. El punto de corte de 100 g/L (10 g/dL) de hemoglobina también se considera útil para la estratificación del riesgo de los pacientes con MFP [81, 82]. En cuanto al impacto clínico de un cariotipo desfavorable en la supervivencia, estudios

previos no han encontrado una asociación significativa con desarrollo de MF post-PV [76]. Esto probablemente refleje el número pequeño de pacientes con cariotipo desfavorable o la heterogeneidad clínica de los pacientes. El curso de MF post-PV es un proceso dinámico en el que se produce un deterioro progresivo de los parámetros clínicos. Esto puede implicar la adquisición de factores de riesgo adicionales. De hecho, la hemoglobina y las plaquetas tienden a disminuir progresivamente, mientras que los leucocitos tienden a aumentar o disminuir. Por este motivo, se ha desarrollado un sistema de puntuación dinámico que se puede utilizar para predecir la supervivencia en cualquier momento después del diagnóstico [76]. Según este modelo, los pacientes son clasificados en un grupo de riesgo al momento del diagnóstico y permanecen en el mismo grupo hasta la adquisición de nuevos factores de riesgo. Cuando esto se produce, los pacientes entran en una categoría de riesgo mayor. El sistema de puntuación dinámico está basado en el nivel de hemoglobina inferior a 100 g/L (10 g/dl), recuento de plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/L$ , y recuento de leucocitos superior a  $30 \times 10^9 / L$  y es útil para predecir la supervivencia en cualquier momento a partir del diagnóstico. De hecho, la puntuación predice unas 4,2 veces empeoramiento de la supervivencia para cada factor de riesgo adquiridos en cualquier momento durante el seguimiento de MF post-PV. Las curvas de supervivencia resultantes de este modelo dinámico tienen que ser interpretadas de forma diferente a partir de las curvas de supervivencia tradicionales. De hecho, las curvas de supervivencia del modelo dinámico representan una supervivencia estimada, siempre y cuando la paciente permanece en el mismo grupo de riesgo. Por tanto, los pacientes diagnosticados de PV que muestran un recuento de glóbulos blancos de más de  $15 \times 10^9/L$  al diagnóstico tienen mayor riesgo de desarrollar MF post-PV. Cuando pacientes con PV desarrollan MF post-PV, un modelo de pronóstico dinámico basado en el nivel de hemoglobina, recuento de plaquetas y de

glóbulos blancos puede predecir la supervivencia en cualquier momento después del diagnóstico.

### **b.- Progresión a mielofibrosis en Trombocitemia esencial**

En líneas generales y en comparación a los pacientes diagnosticados de PV, la progresión a mielofibrosis es rara en los pacientes diagnosticados de TE [83, 84], sin embargo la prevalencia de evolución a mielofibrosis varía ampliamente, en función del diseño del estudio, la intervención terapéutica y los criterios de diagnóstico aplicados. Los estudios retrospectivos sugieren que en relación a la PV, la mielofibrosis post-TE es un evento más retardado en el tiempo con un riesgo acumulado de 3% a los 5 años, 8% a los 10 años (en líneas generales 3% -10% en la primera década) [3, 44] y 15% después de 15 años ( 6% -30% en la segunda década) [3, 85]. Además es importante destacar que el desarrollo de la fibrosis de reticulina por sí sola no es lo mismo que la transformación a mielofibrosis, y el diagnóstico de mielofibrosis post-TE está reservada para aquellos pacientes que presentan fibrosis de médula ósea, asociado a características clínicas y/o características de laboratorio [86]. Sin embargo una vez confirmada la MF post-TE y dada su estrecha relación con la MFP, los criterios que utilizamos para diagnosticar estas condiciones son esencialmente los mismos que los criterios diagnósticos de la MFP [86] (Tabla 5).



Tabla 5: Criterios diagnósticos de la mielofibrosis primaria y secundaria (Traducido de Beer *et al.*, 2011).

Mielofibrosis primaria		Transformación mielofibrótica desde TE o PV	
Requiere A1 + A2 y cualquiera de dos criterios B.		Requiere A1 + A2 y cualquiera de dos criterios B.	
A1	Fibrosis la médula ósea $\geq 3$ (en una escala de 0-4)	A1	Fibrosis la médula ósea $\geq 3$ (en una escala de 0-4)
A2	Mutación patogénica ( <i>e.g.</i> <i>JAK2</i> o <i>MPL</i> ) o ausencia de BCR-ABL1 y de los efectos de la fibrosis de médula ósea.	A2	Diagnóstico previo de TE o PV.
B1	Esplenomegalia palpable	B1	Nueva esplenomegalia palpable o aumento del tamaño del bazo $\geq 5$ cm
B2	Anemia inexplicable	B2	Anemia inexplicable con una bajada de 2g/dL de la hemoglobina basal.
B3	Síndrome leucoeritroblástico	B3	Síndrome leucoeritroblástico
B4	Hematíes en forma de lágrima.	B4	Hematíes en forma de lágrima.
B5	Síntomas constitucionales*	B5	Síntomas constitucionales*
B6	Evidencia histológica de hematopoyesis extramedular.	B6	Evidencia histológica de hematopoyesis extramedular.

Criterios adaptados de Campbell y Green [87]. \* Sudoración profusa, pérdida de peso  $> 10\%$  en 6 meses, fiebre inexplicable ( $>37.5^{\circ}\text{C}$ ) o dolor óseo difuso

Estos criterios son similares a otros utilizados por otras clasificaciones [75, 88] pero no incluyen lactato deshidrogenasa sérica (LDH), ya que no se ha establecido aún una correlación entre el aumento de LDH y la transformación a mielofibrosis ya que el aumento de los niveles de LDH también se encuentran en la mayoría de los pacientes con ET o PV [88].

## c.-Transformación leucémica

Tanto en la MF primaria como en la secundaria a PV o TE, la principal causa de muerte es la transformación leucémica (TL) que ocurre en un 8% a 23% de los pacientes en los primeros 10 años de diagnosis[89, 90]. Un estudio retrospectivo Italiano de 2316 pacientes sugieren una incidencia de aproximadamente 1% [91]. Otros estudios

retrospectivos [3, 85] y en pacientes diagnosticados de TE han demostrado una incidencia leucemia mieloide aguda (LMA) de entre 1% -2,5% en la primera década después del diagnóstico, 5% a 8% en la segunda década, y en aumento con el curso de la enfermedad. En líneas generales, la transformación leucémica en pacientes diagnosticados de TE es de baja incidencia (0,6 a 6,1%), tardía, con una mediana de aparición de 6,5 años [92, 93] y representa la complicación más grave de la TE[94]. Por otra parte, la asociación entre leucocitosis y el riesgo de leucemia ha sido recientemente descrito en pacientes con PV [41] pero no en TE. Este estudio demuestra que los pacientes con PV con leucocitosis, tienen mayor riesgo de evolución a LAM. La leucemia se presenta con una incidencia de 50/1000 personas-año, y los niveles de CD34 circulantes al momento del diagnóstico de la MF post-PV puede predecir la supervivencia libre de leucemia. La frecuencia de transformación leucémica en pacientes con MF post-PV parece más alto que en pacientes con MFP [95]. La transformación a LMA se diagnostica por la presencia de blastos  $\geq 20\%$  en sangre y/o médula ósea. Existen pocos datos sobre los hallazgos patológicos y citogenéticos, así como los resultados del tratamiento de la transformación leucémica en la MF. Se ha descrito [95] que 98% de los pacientes con transformación leucémica tras el diagnóstico de MF muere después de una mediana de menos de 3 meses y es poco probable la remisión completa tras la quimioterapia de inducción estándar. El pronóstico aún empeora más en el caso de desarrollo de LAM de mal pronóstico como LMA-M7, LAM-M5 y M0 [96]. Dada la dificultad actual de desarrollo de estudios no controlados que especifiquen los factores de riesgo de transformación leucémica, éstos aún no están determinados, sin embargo parece que la progresión a mielofibrosis en pacientes diagnosticados de TE y PV o la exposición previa a agente citotóxico están implicados [93]. La proporción relativamente alta de pacientes (48%) que muestra blastos

circulantes durante la fase inicial diagnóstico del diagnóstico de MF plantea la posibilidad de una asociación significativa con el riesgo de transformación leucémica [3, 89]. Otros factores de riesgo que podrían estar implicados en la transformación leucémica de la MF son la leucocitosis y el cariotipo anormal [81]. Sin embargo, el valor pronóstico de citogenética en el pronóstico de la MF ha sido motivo de controversia y las discrepancias en varios estudios podrían relacionarse con la presencia de diversidad de lesiones específicas [97]. La aparición de nuevas anomalías cariotípicas no detectadas en el momento del diagnóstico no necesariamente implica transformación leucémica en MF sino que confirma el proceso de evolución clonal. Si este tipo de lesiones son el origen de la enfermedad o secundarias a la progresión clonal no está actualmente definido.

## 2.-JAK2

### 2.1.-Antecedentes de las proteínas quinasas y JAK2

Las proteínas cinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, mientras que las proteínas fosfatasas (PP) hacen lo contrario: regular la actividad de PK a través de la desfosforilación [98]. Por consiguiente, las proteínas tirosin-cinasas (PTK) catalizan la transferencia del grupo fosfato de la adenosina (ATP) a los grupos hidroxilo de los residuos específicos de tirosina en las proteínas de transducción de señales.

En general, existen dos categorías de PTK: receptor PTK (RPTK) y PTK citoplasmática (CPTK) [99, 100]. En los seres humanos, hay aproximadamente 90 genes conocidos que codifican PTKs, 58 codifican RPTKs y 32, CPTKs [101]. Ejemplos de RPTKs implicados en las NMPc incluyen el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene*

*homolog*), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y el receptor del factor de crecimiento relacionada con la tirosina quinasa 3, FLT3 (*Fms-Like Tyrosine kinase 3*) [100, 101]. Ejemplos de CPTKs incluyen a la familia de las Janus quinasas con JAK1, JAK2, JAK3, la tirosina quinasa 2 (TYK2) [102, 103], la familia de quinasas SRC (homólogos de la oncoproteína del virus del sarcoma de Rous) [104] y ABL (homólogo de la oncoproteína del virus murino de leucemia Abelson) [105].

### **2.2.-La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis, inmunomodulación y desarrollo.**

Hace algo más de 5 años se definió una nueva vía de señalización intracelular que utiliza como mecanismo de transmisión de la señal la fosforilación secuencial en residuos de tirosina de dos grupos de proteínas: JAK y STAT.

Las proteínas JAK fueron clonadas utilizando la técnica de rastreo por PCR de secuencias génicas que contuviesen dominios con actividad tirosina cinasa [106-109]. Sin embargo, inicialmente este grupo de cinasas no se relacionó con ninguna vía conocida, recibiendo el acrónimo de *Just Another Kinase* (JAK). Más adelante se demostró su asociación con los receptores de las citocinas, y con la transmisión de la señal de activación de éstas a las proteínas STAT [110]. La Janus quinasa 2 (JAK2) es una proteína tirosina quinasa (PTK) citoplasmática y su estructura está especialmente caracterizada por la presencia de dos dominios homólogos quinasa: JH 1 que es funcional y JH2 que carece de la actividad quinasa (es decir, pseudoquinasa) [102, 105, 111, 112].

Por otro lado, las proteínas STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) son proteínas intracelulares, se encuentran en estado latente y se activan al ser fosforiladas por las proteínas JAK. Una vez activadas se trasladan al núcleo, donde se unen al ADN y activan la transcripción génica [113, 114]. Las proteínas STAT, por tanto, son proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción, como describiremos posteriormente. La vía JAK-STAT (receptor-JAK-STAT-ADN) es la vía más importante de transmisión de señal desde los receptores de las citocinas [109]. Además su activación constitutiva se asocia a transformación celular y oncogénesis, tanto de neoplasias hematológicas como epiteliales. Uno de los rasgos más característicos de la vía JAK-STAT es su rapidez. El mecanismo principal de esta transmisión veloz es la fosforilación de residuos específicos de tirosina seguido de la interacción física entre la proteína fosforilada y otras proteínas que poseen dominios SH-2. Los dominios SH-2 son secuencias de aminoácidos que reconocen específicamente residuos de fosfotirosina concretos [115]. De esta forma, la asociación fosfotirosina/SH-2 posibilita la interacción entre múltiples proteínas transductoras de señal y la transmisión de la información entre sí [116]. Paradójicamente, la mayoría de los receptores de las citocinas carecen de actividad cinasa intrínseca, por lo que son incapaces de iniciar directamente esta cadena de fosforilaciones [117]. En su lugar, se asocian a estas cinasas estructuralmente únicas: las JAK.

Las proteínas JAK son CPTK que se asocian estrechamente a los dominios citoplasmáticos de los receptores de las citocinas [118]. La interacción de las citocinas con sus receptores (por ejemplo, EPO, MPL, IL-3, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de granulocitos y macrófagos (*GM-CSF*) induce dimerización u oligomerización de los mismos y, en consecuencia, aproxima las proteínas JAK asociadas a receptores vecinos [109]. Este acercamiento de las proteínas JAK permite su

fosforilación recíproca, y el aumento de su actividad enzimática [25, 26, 119]. Por otra parte, las proteínas JAK fosforilan los residuos de tirosina en las porciones intracelulares de los receptores, creando puntos de anclaje de las proteínas STAT, que poseen un dominio SH-2 (fosfotirosina del receptor con dominio SH-2 de la STAT) [120, 121] (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

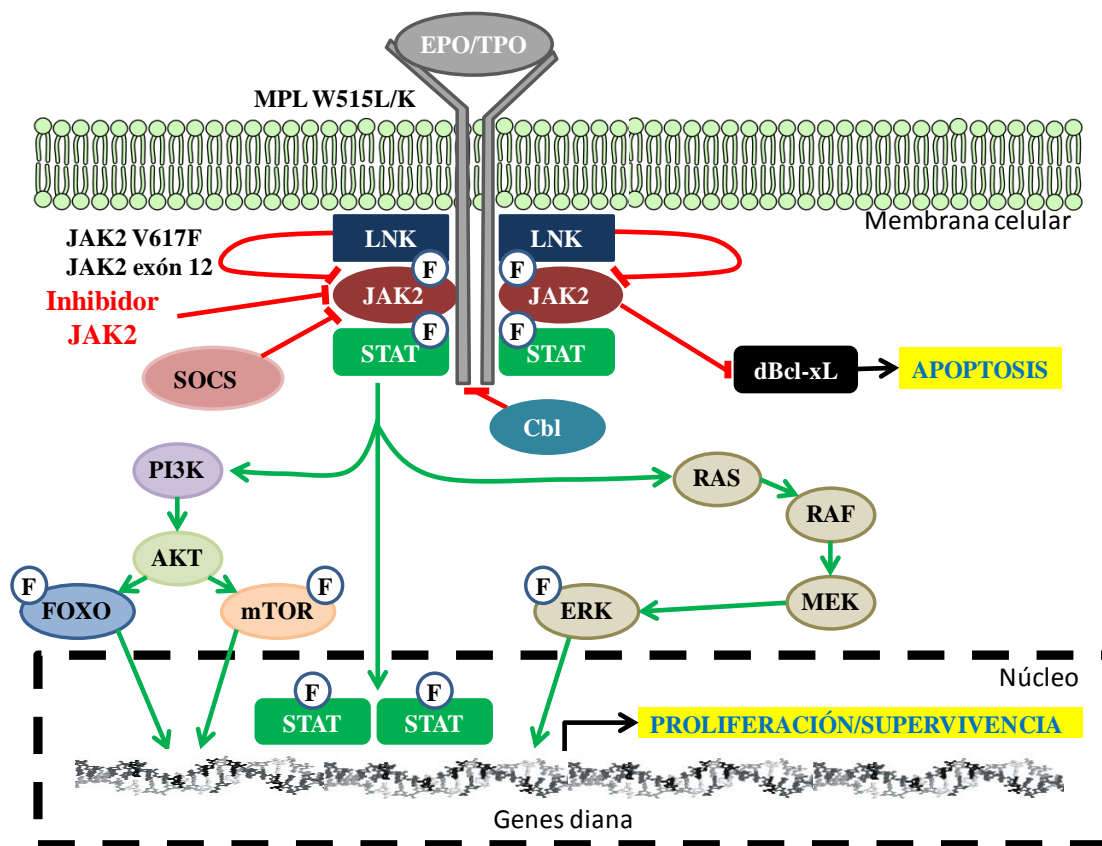


Figura 3 Vía de señalización JAK-STAT y componentes relacionados con las neoplasias mieloproliferativas crónicas (Modificado de Levine *et al.*, 2010). EPO, eritropoyetina; TPO, trombopoyetina; F, grupo fosfato; LNK, *CG17367 gene product from transcript CG17367-RC*; JAK2, Janus kinase 2; STAT, signal-transducer and activator of transcription protein; SOCS, Suppressor of cytokine signaling; Cbl, Casitas B-lineage lymphoma; dBcl-xL, B-cell lymphoma-extra large; RAS, rat sarcoma viral oncogene homolog; RAF, raf murine sarcoma viral oncogene homolog; MEK, MAP kinase-ERK Kinase; ERK, elk-related tyrosine Kinase; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; AKT, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; FOXO, forkhead box, sub-group O; mTOR, mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase).

Una vez unidas al receptor, las proteínas STAT están al alcance de la actividad cinasa de las JAK, y son fosforiladas por éstas [122]. Esta dualidad estructural y funcional de

las proteínas JAK determinó la denominación de Janus quinases en honor de Jano, el dios con dos rostros de las puertas romanas. Las proteínas JAK, como Jano, «miran» tanto hacia fuera, fosforilando al receptor, como hacia dentro, fosforilando a las proteínas STAT. Una vez fosforilada las proteínas STAT, se produce una interacción recíproca entre la tirosina fosforilada de cada proteína STAT con el dominio SH-2 de la proteína STAT vecina. Esta doble interacción STAT/STAT predomina sobre la unión sencilla receptor/STAT, libera las proteínas STAT del receptor y las asocia en homodímeros o heterodímeros. La dimerización capacita a las proteínas STAT para pasar del citoplasma al núcleo celular. Una vez en el núcleo, los dímeros STAT se unen directamente a secuencias específicas de ADN denominadas *GAS* (*Gamma-interferón Activated Sequences*) e *ISRE* (*Interferon-Stimulated Response Element*), desde donde activan la transcripción de los genes [114]. Más allá de esta secuencia lineal descrita, JAK y STAT participan de redes de señalización más complejas.

Por ejemplo, las proteínas STAT pueden ser activadas directamente, sin participación de las proteínas JAK, bien por receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca como el de EGF [123], o por otras tirosincinasas intracelulares como Src (*Rous sarcoma oncogene*). Por otro lado, las proteínas JAK, desde su unión íntima con los receptores parecen originar señales que se ramifican en varias direcciones, y no sólo hacia las proteínas STAT. Además de la activación de las STAT mediante fosforilación, la modulación de su actividad se ejerce también a otros niveles. Las proteínas STAT, una vez en el núcleo, se pueden unir a otros elementos activadores de la transcripción, como p300/CBP (*STAT1* y *STAT2*) en el caso de las señales inducidas por los interferones, el receptor de los glucocorticoides con STAT5, o ATRA en células de leucemia promielocítica [124].

Por otro lado se ha demostrado degradación de las proteínas STAT como mecanismo de control de la vía, y la existencia de proteínas que compiten con la unión de las proteínas STAT al ADN, bloqueando su acción. Todas estas interconexiones y modulaciones con otras vías y factores, generan una respuesta final integrada y equilibrada.

La vía JAK-STAT es importante para una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación celular, así como en el funcionamiento normal del tejido hematopoyético, inmunológico y cardíaco. Además ejerce control sobre la supervivencia celular y apoptosis, con efecto contrario según los sistemas. Por todo ello es de esperar que las alteraciones en procesos de regulación de la vía JAK-STAT pueda conducir a la oncogénesis y que su activación constitutiva se asocie a transformación maligna. La vía JAK/STAT de señalización está regulada a múltiples niveles como, por ejemplo, desfosforilación directa de JAK2 por la proteína tirosina fosfatasa (PTP) (por ejemplo, SHP-1), la degradación proteolítica de JAK2 a través de la unión con una familia de supresores de la señalización de citoquinas (por ejemplo, SOCS y LNK) y la inhibición de la unión de las proteínas STAT a ADN [125-128]. Actualmente, se está investigando el papel de las vías inhibitorias en la regulación de la señalización JAK-STAT en los pacientes diagnosticados de NMPC [5]. Se ha demostrado en modelos animales que la pérdida de Lnk acelera y exacerba oncogénicos de enfermedades mieloproliferativas (MPD) inducida por JAK2 [129]. De modo que, la pérdida de los programas celulares de control de la apoptosis e hiperproliferación junto con la adquisición de nuevas anormalidades moleculares, probablemente estén contribuyendo a la expansión clonal y a la progresión a leucemia mieloide aguda (LMA) en NMPC (Figura 4) [130]. En este sentido, la acción de algunos fármacos antitumorales podría estar mediada, al menos parcialmente, por su efecto sobre la vía JAK-STAT.



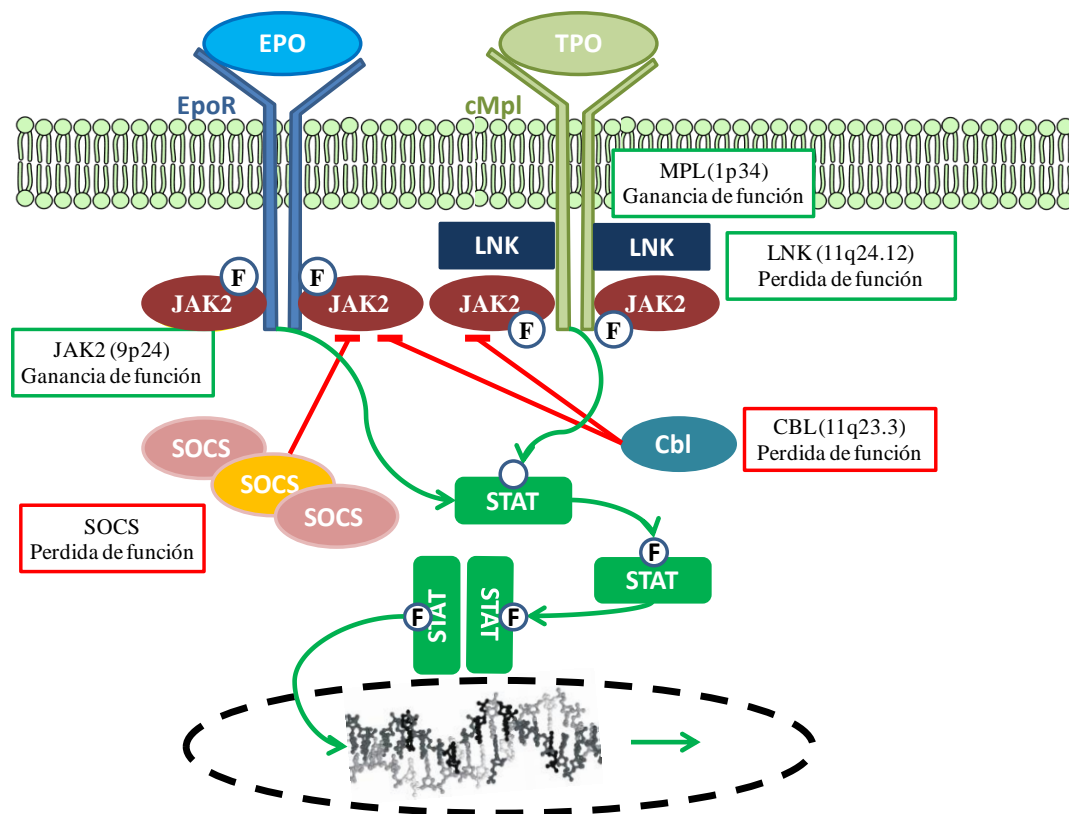


Figura 4: Influencia de las mutaciones en la regulación de la vía JAK2 (Modificado de Vannucchi *et al.*, 2009). F, grupo fosfato; LNK, *CG17367 gene product from transcript CG17367-RC*; JAK2, *Janus kinase 2*; STAT, *signal-transducer and activator of transcription protein*; SOCS, *Suppressor of cytokine signaling*; Cbl, *Casitas B-lineage lymphoma*; EPO, eritropoyetina; EpoR, receptor de eritropoyetina; cMpl, *myeloproliferative leukemia virus oncogene*; TPO, trombopoyetina.

## 2.3.-Mutaciones de JAK2

El gen JAK2 está situado en el cromosoma 9p24, e incluye 25 exones y su proteína 1.132 aminoácidos. La proteína JAK2 es una de las cuatro proteínas tirosina cinasa perteneciente a la familia Janus (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2). Las proteínas JAK1, JAK2 y Tyk2 se expresan en todas las células de los mamíferos, mientras que la expresión de JAK3 se limita a las células hematopoyéticas. Las mutaciones JAK3 en la línea germinal se han asociado con ciertos síndromes de inmunodeficiencia combinada severa de herencia autosómica recesiva [103, 131].

Es conocido que mutaciones en *JAK1*, *JAK2* y *JAK3* han sido asociadas a neoplasias tanto linfoides y mieloides [132]. Sin embargo hemos de destacar, por su especial

relevancia en las NMPC, el descubrimiento de la mutación V617F en el 2004 y su posterior publicación en 2005 [133-136].

### **2.3.1.-La mutación V617F**

La mutación V617F en el gen JAK2 es con diferencia la mutación más frecuente en NMPC *BCR-ABL* negativo (95% de los pacientes con PV, en 55% con ET y en 65% con MFP) [135], pero no es específica de NMPC. También se ha detectado en algunos pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) y NMPC (por ejemplo, la anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis) y, raramente, en la leucemia mieloide aguda primaria (LAM), leucemia linfóide aguda de células T y células pre-B, SMD o leucemia mieloide crónica (LMC) [137-139].

La mutación somática JAK2V617F es la sustitución de una guanina (G) por timina (T) en el exón 14 de JAK2, que conduce a un cambio de nucleótido en la posición 1849 y la sustitución de valina a la fenilalanina en el aminoácido 617 [140]. Las NMPC incluyen entidades clínicamente distintas, planteando la cuestión de cómo esta única mutación podría dar lugar a tal diversidad fenotípica. Los modelos en ratón iniciales y los estudios clínicos posteriores han demostrado que el nivel de expresión de JAK2V617F (carga alélica) pueden determinar el fenotipo clínico (PV, TE y MFP) [5], como veremos posteriormente.

Además de la carga alélica, el impacto de JAK2 V617F en el fenotipo de enfermedad puede estar relacionado con la línea celular donde se detecte la mutación. Este hecho sugiere que la mutación induce la diferenciación eritroide o que se dirige preferentemente a un subconjunto de células hematopoyéticas que corresponden a la serie roja [141].

Estos hallazgos sugieren que serán necesarios más estudios para aclarar la forma en que este fenómeno puede contribuir a la heterogeneidad de la enfermedad de NMPC.

Una alternativa para explicar la diversidad de fenotipos asociados a la mutación V617F, es que un evento adicional puede preceder a la adquisición de JAK2 V617F, y que esta alteración puede ser responsable de conferir el subtipo específico de las NMPC.

### **2.3.2.-Más allá de JAK2 V617F: mecanismos alternativos de la patogénesis de las NMPC.**

A pesar de que la mutación V617F se puede identificar en casi todos los pacientes con PV, así como aproximadamente el 50-60% de pacientes con ET y MFP, aún existe un gran número de pacientes que carecen de esta anomalía genética. Incluso en estos pacientes carentes de la mutación V617F, la activación de la señalización JAK-STAT puede ser demostrada, lo que sugiere que las alteraciones en otros componentes de esta vía puede ser responsable de conducir a la patogénesis de la NMPC JAK2V617F negativa. Además se han descrito mutaciones afectando a la regulación epigenética y asociadas con la transformación leucémica (Figura 5) [142].

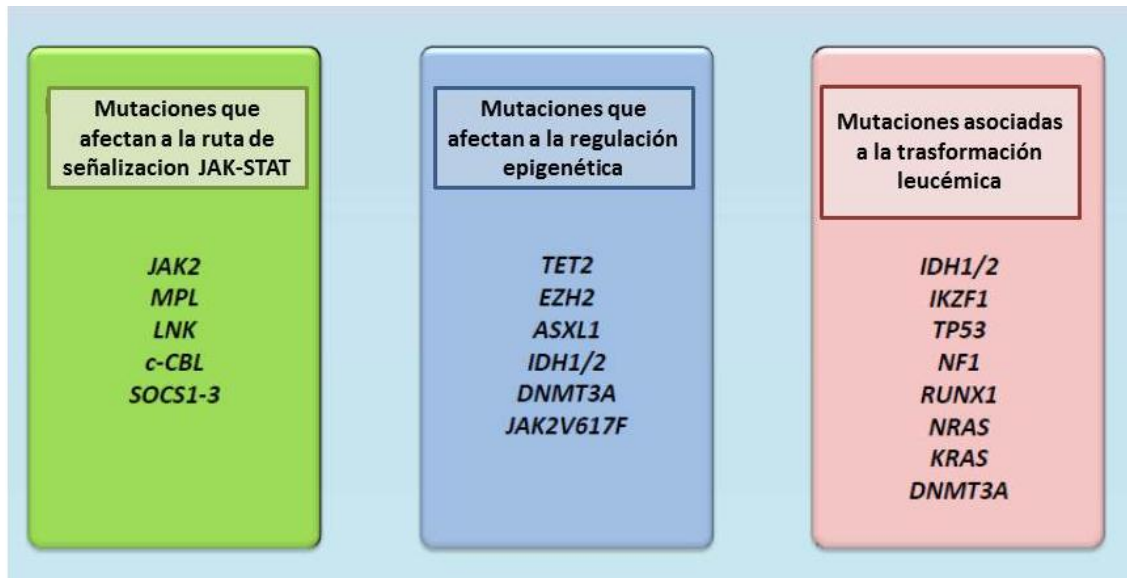


Figura 5. Los genes alterados responsables de conducir a la patogénesis de las NMP. En la figura se muestran: (A) Las mutaciones que afectan a la ruta de señalización JAK-STAT; (B) Las mutaciones que afectan a la regulación epigenética y (C) Las mutaciones asociadas a la transformación leucémica. (Modificado de Tefferi *et al.*, 2007).

## 2.3.2.1.-Mutaciones del exón 12

Las mutaciones del exón 12 son relativamente específicas para las NMPC JAK2V617F negativa. Fueron descritas por primera vez por Scott *et al.* en diez pacientes con diagnóstico inicial de eritrocitosis idiopática (Figura 6) [5, 143-145]. Estas mutaciones se encuentran en el extremo 5' del dominio pseudoquinasa de la proteína JAK2, y al igual que V617F, se especula que es causa de un cambio estructural que resulta en la activación de JAK2.

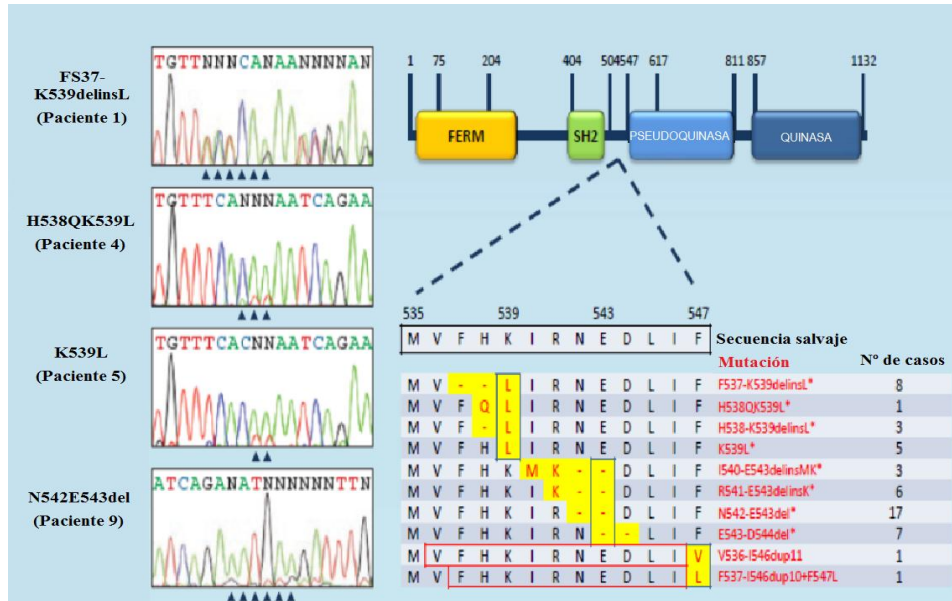


Figura 6. Mutaciones en el exón 12 del gen JAK2. La figura muestra el gen JAK2, la secuencia nativa del exón 12 del gen JAK2 y las mutaciones descritas en el exón 12. Además el número de casos con cada mutación descrita del exón 12 del gen JAK2

Los estudios han identificado N542-E543del como la más frecuente de las mutaciones descritas en el exón 12 [5]. En el marco de mutaciones del exón 12 se incluyen deleciones, mutaciones puntuales y duplicaciones, que afecta principalmente a siete residuos de aminoácidos (F537-E543) [144-147]. Como su mutación homóloga en el exón 14 (JAK2V617F), la mutación K539L en el exón 12 también se ha asociado a eritrocitosis en pacientes diagnosticados de PV [143]. En líneas generales los pacientes positivos para las mutaciones en el exón 12 de *JAK2* suelen ser heterocigotos para la mutación y se caracterizan por mielopoyesis predominantemente eritroide, bajo nivel de eritropoyetina en el suero y una menor edad al momento del diagnóstico [143, 148]. El curso clínico de estos pacientes parece ser similar a la de los pacientes diagnosticados de PV JAK2V617F positivo. Estos hallazgos sugieren que en prácticamente todos los pacientes con PV, puede ser identificados una mutación en *JAK2* [146, 149]. Sin embargo, en contraste con la mutación V617F, las mutaciones en el exón 12 son exclusivas de la PV.

Las mutaciones en el gen *EpoR* (*Erythropoietin Receptor*) se han asociado a la fosforilación constitutiva de JAK2 y STAT5 [150] y se han reportado en algunos casos de Policitemia familiar pero no en PV esporádicos [151, 152].

### **2.3.2.2.- Mutaciones en *MPL***

El gen *MPL* (*MyeloProliferative Leukemia virus oncogene*), se encuentra en el cromosoma 1p34, incluye 12 exones y codifica para el receptor de la trombopoyetina (aminoácidos 635-680) [153, 154]. *MPL* es clave para el crecimiento y constituye el factor de supervivencia para los megacariocitos [155] (Figura 7). Las mutaciones en *MPL* han sido reportadas en un pequeño número de los pacientes diagnosticados de ET (1%) y PMF (5%)[153, 154]. Algunas mutaciones en *MPL* (S505N) se han asociado con trombocitosis familiar pero en líneas generales se trata de mutaciones somáticas asociadas con un fenotipo de NMPC incluyendo esplenomegalia, mielofibrosis y un mayor riesgo de trombosis. Son mutaciones de baja incidencia y su detección se limita en gran medida a los pacientes con NMP, aunque se ha descrito algún caso en pacientes con leucemia aguda megacariocítica. Destacamos la mutación W515L que es el resultado de una sustitución de G por T en el exón 10 del gen *MPL*, que conduce a un cambio de nucleótido en la posición 1544 y la sustitución de triptófano por leucina en el codón 515. La mutación W515L fue descrita por primera vez en 2006 entre los pacientes diagnosticados de MFP JAK2V617F negativo e induce una enfermedad similar a MFP con trombocitosis en ratones [153].

La detección de la mutación W515L condiciona la aparición de leucocitosis grave, trombocitosis, esplenomegalia y la fibrosis de reticulina, pero no eritrocitosis [5]. Posteriormente, se han descrito otras mutaciones en exón 10 del gen *MPL* (W515K, W515S y S505N) en un 3 a un 15% de los pacientes diagnosticados de TE y MFP [154,

156, 157]. De todas las mutaciones asociadas a NMPC, W515L es la más frecuente, mientras que S505N también ocurre en la trombocitopenia hereditaria. En ningún caso, las mutaciones en *MPL* fueron encontradas en PV u otros trastornos de origen mieloide, como SMD, LMMC (Leucemia Mielomonocítica crónica) o LAM.

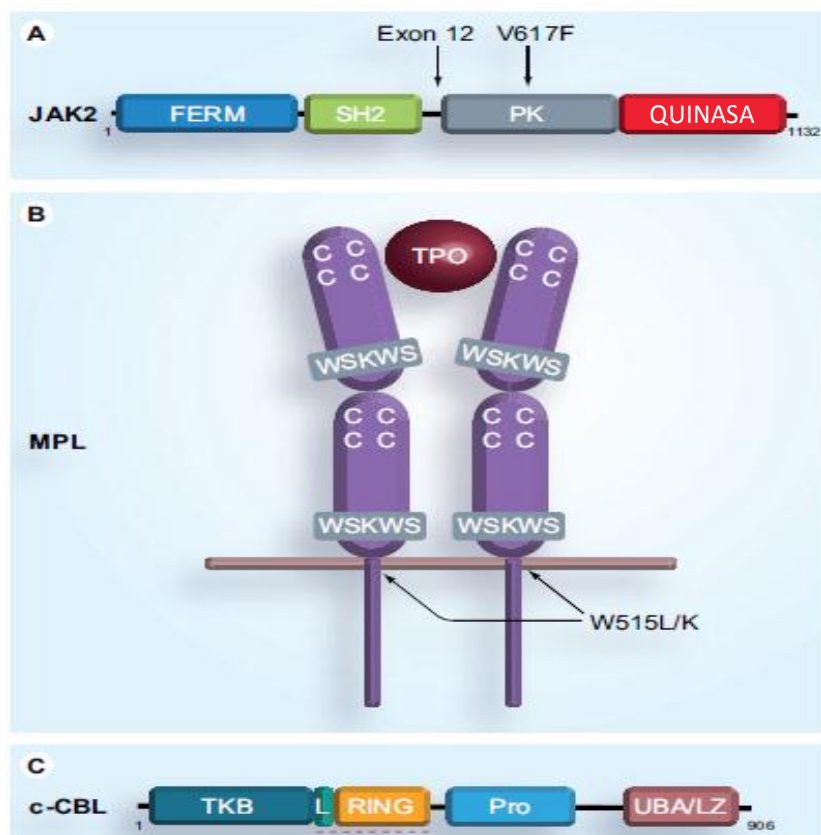


Figura 7. Estructura de los genes *JAK2* (A) y *c-CBL* (C), y de la proteína *MPL* (B), y localización de las mutaciones en las neoplasias mieloproliferativas crónicas (traducido de Stephen *et al.*, 2010). FERM, 4.1 Protein Ezrin Radixin Moesin domain, C, cisteína; L, Linker (enlace); LZ, Leucine zipper (cremallera de leucinas); PK, pseudokinase (pseudoquinasa); Pro: Prolin rich (región rica en prolinas); RING, dedo de zinc; TKB, Tirosin Binding Kinase (quinasa de unión a tirosina); UBA, asociado a ubiquitina.

### **3.-JAK2 y NMPC Ph(-)**

#### **3.1.-Clasificación diagnóstica de las NMPC.**

Los trastornos mieloides de acuerdo con la clasificación de la OMS 2008 incluyen la leucemia mieloide aguda (LMA) y las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC). La LMA se define por la presencia de  $\geq 20\%$  blastos, ya sea en médula ósea o en sangre [158]. Las NMPC clásicas incluyen la LMC, ET, PV y MF [159]. Estas cuatro entidades clínicas fueron descritas entre 1845 y 1934 y fue en 1951 cuando William Dameshek las agrupó bajo el término de *myeloproliferative disorders* (MPD) basándose en sus mismas manifestaciones clínicas y datos analíticos. Entre 1967 y 1981, Fialkow y sus colegas utilizaron la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como un marcador celular para establecer las NMPC como enfermedades clonales de la médula ósea [160].

La aplicación de los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para NMPC, en ocasiones es difícil dado su énfasis en los criterios histológicos (Tabla 6) [161].



Tabla 6: Criterios diagnósticos de la OMS para TE, PV y MFP

	<b>Policitemia vera *</b>	<b>Trombocitemia esencial *</b>	<b>Mielofibrosis primaria *</b>
<b>Criterios mayores</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 • Hb &gt;18.5 g/dl (hombre); &gt;16.5 g/dl (mujer), o bien • Hb o Hto &gt; percentil 99 del rango de referencia para la edad, el sexo o la altitud de residencia, o bien • Masa elevada de glóbulos rojos &gt; 25% por encima del valor promedio predicho normal, o bien • Hb &gt; 17 g/dL (hombres) o &gt; 15 g/dL (mujeres) si se asocia con un aumento sostenido <math>\geq 2</math> g/dL de la línea base que no se puede atribuir a corrección de la deficiencia de hierro.</li> <li>2 Presencia de JAK2V617F o de otra mutación similar.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Contaje plaquetario <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li> <li>2 Proliferación de megacariocitos con morfología grande y maduros.</li> <li>3 No cumplir con criterios de la OMS para la LMC, PV, MF, SMD u otro neoplasma mielóide.</li> <li>4 Demostración de JAK2V617F u otro marcador clonal o ninguna evidencia de trombocitosis reactiva.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 • Proliferación de megacariocitos y atipia ** acompañadas por reticulina y/o fibrosis del colágeno o bien, • en ausencia de fibrosis de la reticulina, los cambios de megacariocitos deben ir acompañados por un aumento de la celularidad de la médula, proliferación granulocítica y, a menudo, reducción de la eritropoyesis (es decir, una MF pre-fibrótica).</li> <li>2 No cumplir con criterios de la OMS para la LMC, PV, SMD u otro neoplasma mielóide.</li> <li>3 Demostración de JAK2V617F u otro marcador clonal o ninguna evidencia de trombocitosis reactiva.</li> </ol>
<b>Criterios menores</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Médula ósea con trastorno mieloproliferativo trilineaje.</li> <li>2 Nivel de EPO en suero infra normal.</li> <li>3 Crecimiento de colonias eritroides endógenas (CEE).</li> </ol>		<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Leucoeritroblastosis.</li> <li>2 LDH en suero aumentado.</li> <li>3 Anemia.</li> <li>4 Esplenomegalia palpable.</li> </ol>

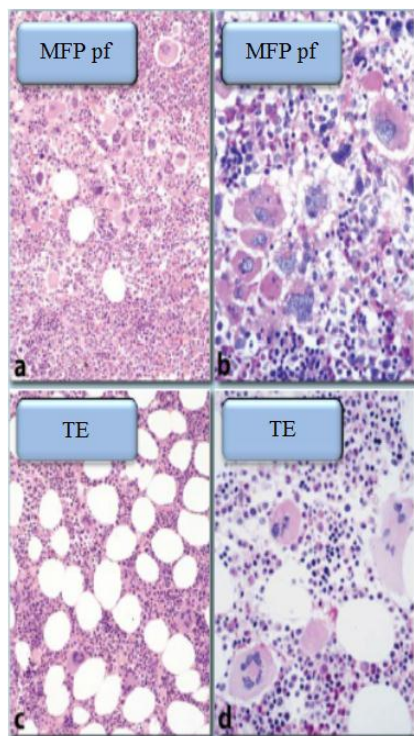
Abreviaturas: OMS, Organización Mundial de la Salud; ; Hto, hematocrito; Hb, hemoglobina; LMC, leucemia mielóide crónica; EPO, eritropoyetina; PV, policitemia vera; TE, trombocitemia esencial; MF; mielofibrosis; SMD, síndrome mielodisplásico; LDH, deshidrogenasa láctica.

\* El diagnóstico de PV exige reunir los dos criterios mayores y uno menor o bien el primer criterio mayor y 2 menores. El diagnóstico de TE requiere cumplir con los cuatro criterios mayores. El diagnóstico de MF requiere cumplir con los tres criterios mayores y dos criterios menores.

\*\* De pequeños hasta grandes megacariocitos con un ratio núcleo/citoplasma aberrante, núcleos hiperromáticos y un núcleo plegado de manera irregular y con una agrupación densa.

La mielofibrosis puede ocurrir en la llamada forma pre-fibrótica sin ningún tipo de evidencia clínica significativa de fibrosis (figura 8) [84, 162]. Además, los pacientes que se presentan con trombocitosis y fibrosis reticulínica significativa (es decir, mayor que grado 2/4) pero sin embargo sin las características de MFP, como la anemia o

esplenomegalia, leucoeritroblastos no puede ser clasificado de MFP y debe conservar la etiqueta de "MPN sin clasificar."



### **Mielofibrosis prefibrótica:**

- Hipercelularidad
- Agrupación prominente de megacariocitos anormales.
- Núcleos hiperlobulados e hipercromáticos.
- Proliferación granulocítica.

### **Trombocitemia esencial:**

- Normocelularidad.
- Megacariocitos grandes a gigantes, dispersos.

Figura 8: Hallazgos histológicos diferenciales entre la mielofibrosis en fase prefibrótica y la trombocitemia esencial. Las figuras (a) y (b) corresponden al diagnóstico de mielofibrosis fase prefibrótica y (c) y (d) al diagnóstico de TE.

En un mismo paciente la enfermedad puede cambiar de una entidad a otra, o peor aún, superponerse y, a veces la terminología confusa puede ser utilizada por los médicos: por ejemplo, metaplasia mieloide agnogénica, mielofibrosis idiopática, mielofibrosis primaria o secundaria, transformación de fase crónica a fase acelerada, etc. La revelación en 2004-2005 de la mutación V617F las agrupó en NMPC Ph (-) como una categoría distinta de la LMC, SMD y NMPC atípicos [130, 158].

Tabla 7: Clasificación semi-molecular de las NMP crónicas (traducido de Tefferi *et al.*, 2006).

	Categorías principales	Subcategorías
<b>I. NMP Clásicas</b>	1. <i>BCR-ABL</i> -positiva	Leucemia mieloide crónica (LMC)
	2. <i>BCR-ABL</i> -negativa	A) Policitemia vera (~100% JAK2V617F+) B) Trombocitemia esencial (~50% JAK2V617F+) C) Mielofibrosis (~50% JAK2V617F+)
<b>II. NMP atípicas</b>	1. Leucemia mielomonocítica crónica.	
	2. Leucemia mielomonocítica juvenil (frecuentes mutaciones en <i>PTP11</i> , <i>NF1</i> y <i>RAS</i> )	
	3. Leucemia neutrofílica crónica (~20% JAK2V617F+)	
	4. Leucemia eosinofílica crónica / NMP eosinofílica.	A) <i>PDGFRA</i> -reordenado ( <i>e.g.</i> , <i>FIP1L1-PDGFR</i> ) B) <i>PDGFRB</i> -reordenado ( <i>e.g.</i> , <i>TEL/ETV6-PDGFRB</i> ) C) <i>FGFR1</i> -reordenado ( <i>e.g.</i> , <i>ZNF198/FIM/RAMP-FGFR1</i> o síndrome mieloproliferativo 8p11). D) Molecularmente indefinida.
	5. Síndrome de hipereosinofilia.	
	6. Leucemia basofílica crónica.	
	7. Mastocitosis sistémica.	A) <i>PDGFRA</i> -reordenado ( <i>e.g.</i> , <i>FIP1L1-PDGFR</i> ) B) <i>KIT</i> -mutado ( <i>e.g.</i> , <i>KITD816V</i> ) C) Molecularmente indefinido.
	8. NMPC no clasificadas (~20% JAK2V617F+)	A) Mezcla/superposición de síndrome mielodisplásico (SMD)/ síndrome mieloproliferativo (SMP). B) Similar a LMC pero <i>BCR-ABL</i> negativo.

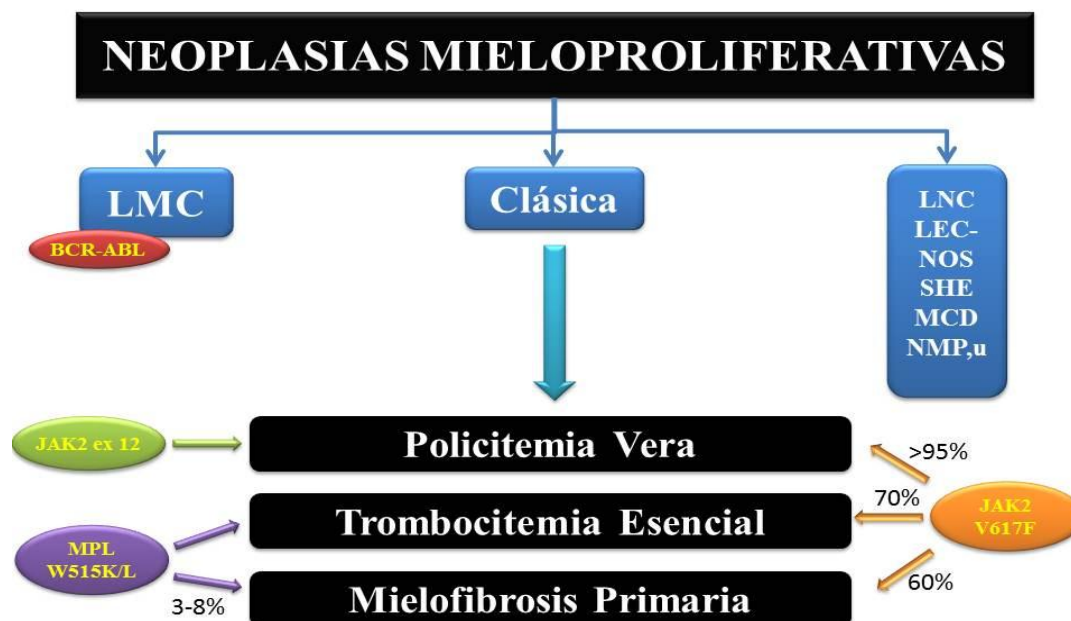


Figura 9: Clasificación semi-molecular de las NMP crónicas en función de las mutaciones detectadas. Dentro de las NMPC incluimos la leucemia mieloide crónica (LMC), que se caracteriza por presentar el cromosoma filadelfia (Ph+), y las NMPC Ph- clásicas: policitemia vera (PV), trombocitemia esencial

(TE) y mielofibrosis primaria (MFP). LMC: leucemia mieloide crónica; LNC: leucemia neutrofílica crónica; LEC-NOS: leucemia eosinofílica crónica; SHE: síndrome hipereosinofílico; MCD: mastocitosis sistémica; NMP,u: neoplasias mieloproliferativas crónicas no clasificadas.

Dada las limitaciones de la clasificación de la OMS, algunos estudios han revisado la clasificación de la NMPC y han decidido dividirlos en NMPC JAK2V617F negativa o JAK2V617F positiva [163].

Las NMPC Ph (-) y la LMC, estarían bien caracterizadas, de ahí la posibilidad de un sistema de clasificación molecular (Tabla 7, Figura 9) [158],[164] Dentro del grupo de pacientes diagnosticados de TE y MF, se han intentado establecer subgrupos, en base a la presencia o ausencia de JAK2V617F. Ni el pronóstico ni el tratamiento se han adherido a una mutación específica, sin embargo en los pacientes positivos para la mutación V617F se ha demostrado en la médula ósea hallazgos histológicos propios de PV y en sangre bajas concentraciones de Epo [46]. Hay que destacar que la detección de la mutación V617F depende de la sensibilidad de la prueba y el nivel de carga alélica [165]. El impacto clínico de mutaciones menos prevalentes como mutaciones en *MPL* o mutaciones en el exón 12 de *JAK2* es menor [166]. Algunos estudios han considerado poco relevante subdividir NMPC Ph(-) en tres entidades diferentes (ET, PV y PMF) y las consideran un proceso continuo de condiciones similares a las diferentes fases de la LMC (Figura 10) [163]. La MFP representaría la fase avanzada y de alto riesgo de leucemia mieloide aguda (LMA) mientras que la TE y PV corresponderían con la fase crónica (10) [163].

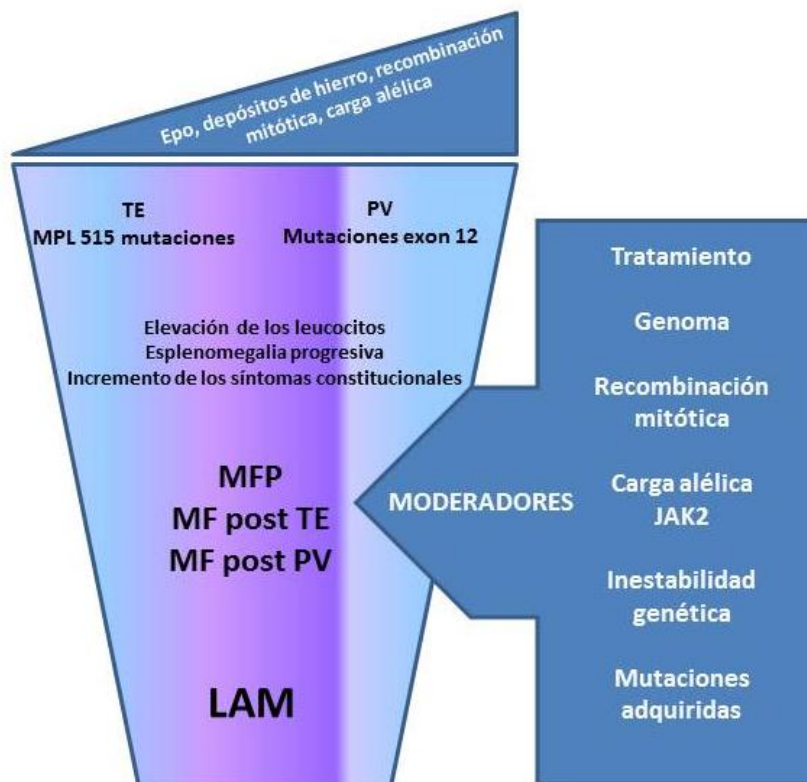


Figura 10: Modelo continuo para la reclasificación de las NMP. (Modificado de Harrison, 2010).

A diferencia de la LMC, la tasa de progresión de los pacientes con TE/PV/MFP es lenta, no es inevitable y los pacientes pueden presentarse en cualquier punto del espectro de la enfermedad. La progresión puede ocurrir, por ejemplo, cuando los pacientes son homocigotos para la mutación V617F o adquieren mutaciones adicionales, algunas aún sin identificar, o desarrollan esplenomegalia refractaria o leucocitosis no controlada o anomalías citogenéticas adicionales. Este modelo llamado "modelo de proceso continuo", refuerza un cuerpo creciente de investigación que propone la reclasificación de las NMPC (Figura 10).

### 3.1.1.-Trombocitemia Esencial vs Policitemia Vera.

Varios estudios sugieren que la TE JAK2V617F positiva tiene varias características en común con la PV: mayor nivel de hemoglobina, mayor número de neutrófilos, mayor incidencia de trombosis venosa y una mayor incidencia de transformación a PV [46]. Los pacientes diagnosticados de TE JAK2V617F positivas tienen menor eritropoyetina sérica y bajos niveles de ferritina que sugiere que su capacidad de generar una eritrocitosis puede ser limitada. En un estudio previo que comparo 179 pacientes diagnosticados de TE y 77 diagnosticados de PV JAK2V617F positivos demostró un "gradiente" en los valores de laboratorio entre los pacientes con ET de tipo salvaje, TE JAK2V617F positiva y PV. Además, la tasa de complicaciones trombóticas en los pacientes diagnosticados de TE JAK2V617F positivos fue significativamente mayor que en los pacientes de tipo salvaje, pero no estadísticamente diferente de pacientes diagnosticados de PV [167]. La sugerencia de que la TE JAK2V617F positiva en comparación con TE de tipo salvaje se asocia con mayor riesgo trombótico se ha confirmado en un meta-análisis, pero el riesgo relativo es relativamente débil [168]. Los hallazgos anteriores son concordantes con estudios que demuestran que la presencia de la mutación V617F está fuertemente asociada con la herencia del haplotipo 46/1 en *JAK2* [169]. En líneas generales se considera un diagnóstico de la TE cuando hay una trombocitosis inexplicable y persistente (Recuento de plaquetas  $> 450 \times 10^9 /L$ ). TE ha sido tradicionalmente un diagnóstico de exclusión, que requieren la ausencia de condiciones reactivas y otros trastornos clonales que pueden presentar trombocitosis (Tabla 8) [86].

Tabla 8: Causas de trombocitosis (traducido de Beer *et al.*, 2011).

<b>Neoplasia mieloide.</b> Trombocitemia esencial Policitemia vera Mielofibrosis primaria Leucemia mieloide crónica Anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis. Síndrome mielodisplásico relacionado con una del(5q) aislada.
<b>Trombocitosis (secundaria) reactiva.</b> Pérdida de sangre o deficiencia de hierro. Infección o inflamación. Neoplasia diseminada. Efecto de fármacos (vincristina, epinefrina, ácido todo-trans-retinoico). Hipoesplenismo o ausencia congénita del bazo. Anemia hemolítica.
<b>Trombocitosis familiar.</b> Mutaciones en TPO, MPL, o genes desconocidos.
<b>Trombocitosis espuria.</b> Crioglobulinemia. Fragmentación citoplasmática que acompaña a la neoplasia mieloide o linfoide. Fragmentación de glóbulos rojos.

El descubrimiento de la mutación V617F en el gen *JAK2* y de las mutaciones en *MPL* permite ahora la identificación de TE JAK2V617F positiva en más de la mitad de todos los casos. Algunos estudios consideran la detección de la mutación JAK2 V617F en la investigación inicial realizada en todos los pacientes con sospecha de TE [86], seguido por la detección de mutaciones en el exón 10 de *MPL* en los casos negativos para la mutación V617F. Las pruebas de detección de mutaciones en el gen *TET2* no se realizan actualmente porque las mutaciones están presentes en una amplia gama de otras neoplasias mieloides [170], la detección no es sencilla y la importancia pronóstica de las mutaciones en *TET2* en la TE es actualmente desconocida. En presencia de una

mutación en los genes *JAK2* o *MPL*, un diagnóstico de la TE requiere la exclusión de la PV y MFP. Con este fin, sería necesario un examen de sangre periférica y la evaluación de hierro. Un recuento normal de hemoglobina en un paciente con depósitos de hierro normales suele ser suficiente para excluir a PV. La ferritina sérica reducida y / o hierro ausente en la médula ósea también pueden ocurrir en pacientes diagnosticados de TE. Además la combinación de microcitosis y un recuento normal de hemoglobina en pacientes con leucocitos *JAK2V617F* positivo es muy sugerente de PV con deficiencia de hierro. Algunos estudios consideran que , en general, la PMF pueden ser excluida por la ausencia de esplenomegalia significativa, anemia inexplicable, dacriocitos y un frotis de sangre con leucoeritroblastos [86]. Una minoría de pacientes con leucemia mielomonocítica crónica es positiva para la mutación V617F, aunque estos casos por lo general carecen de trombocitosis, con características adicionales como leucocitosis, monocitosis y esplenomegalia [171]. En los pacientes con sospecha de TE que carecen de mutaciones en *JAK2* y *MPL*, la exclusión de las causas reactivas es especialmente importante (Figura 11) [86]. En estudios de pacientes no seleccionados con trombocitosis, menos del 20% se diagnostico de una enfermedad hematológica[172]. Por tanto, se aconseja una cuidadosa historia, la evaluación de los marcadores inflamatorios (proteína C reactiva y/o velocidad de sedimentación) y la histología de médula ósea.



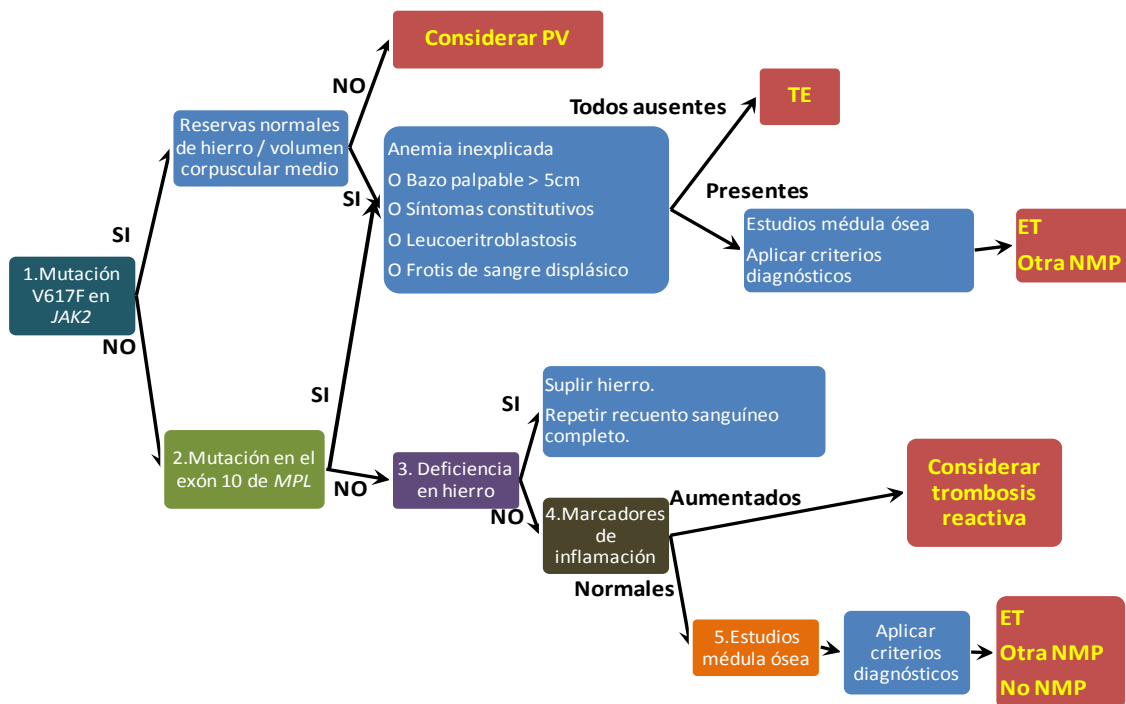


Figura 11: Algoritmo diagnóstico de la trombocitosis (traducido de Beer *et al.*, 2011).

En los pacientes diagnosticados de TE, el análisis citogenético puede ser considerado. Se han detectado trisomías de los cromosomas 8 y 9 y deleciones en 20q y 13q, sin embargo las lesiones cromosómicas están presentes en sólo 5% de los pacientes al momento del diagnóstico y se desconoce su significado pronóstico [173]. En ausencia de un marcador molecular o de citogenética de la hematopoyesis clonal, el diagnóstico de TE sigue siendo diagnóstico de exclusión. Los criterios de diagnóstico de la TE se presentan en la Tabla 9 [86].

Tabla 9: Criterios diagnósticos de la Trombocitemia Esencial. (Traducido de Beer *et al.*, 2011)

WHO 2008	BCSH 2010
<b>Requiere A1-A4</b>	<b>Requiere A1-A3, A1 + A3-A5</b>
A1: Recuento sostenido de plaquetas $> 450 \times 10^9 / L$	A1: Recuento sostenido de plaquetas $> 450 \times 10^9 / L$
A2: Médula ósea con incremento del número de megacariocitos maduros agrandados; sin aumento significativo de desplazamiento a la izquierda de granulopoyesis o eritropoyesis *	A2: Presencia de una mutación patogenética adquirida (por ejemplo, en <i>JAK2</i> o <i>MPL</i> )
A3: No cumplir con criterios de la OMS para PV, MFP, LCM, SMD o de otra neoplasia mieloide.	A3: Sin otra malignidad mieloide, especialmente PV, MFP, LMC o SMD.
A4: Mutación adquirida o marcador clonal o sin causa reactiva para trombocitosis.	A4: Sin causa reactiva para trombocitosis y reservas normales de hierro.
	A5: Aspirado de médula ósea y biopsia por trepanación muestran números en aumento de megacariocitos con un espectro morfológico con predominio de megacariocitos grandes con núcleos hiperlobulados y abundante citoplasma.

\* Un aumento de la fibrosis reticulínica excluye un diagnóstico de TE. WHO, *World Health Organisation*; BCSH, *British Committee for Standards in Haematology*; LMC, leucemia mieloide crónica, TE, trombocitemia esencial; SMD, síndrome mielodisplásico; NMP, neoplasia mieloproliferativa; MFP, mielofibrosis primaria; PV, policitemia vera.

Algunos estudios han utilizado los criterios del Comité Británico en Hematología (BCSH) para la práctica clínica habitual [174]. Estos criterios son similares a los de la WHO pero se diferencian en tres aspectos importantes [86]. En primer lugar, en presencia de la mutación en *MPL* o *JAK2*, un diagnóstico de TE no requiere necesariamente estudios de médula ósea, dado que otros trastornos mieloides que también se presentan con trombocitosis y mutación en *JAK2* o en *MPL* en general, pueden ser excluidos por las características clínicas y de laboratorio. Sin embargo, en la práctica clínica habitual se suele realizar estudio de médula ósea al momento del diagnóstico. Se trataría de una médula de confirmación y proporciona información sobre el pronóstico, especialmente el grado de fibrosis reticulínica [173]. En la médula ósea por lo general se observa celularidad normal en presencia de megacariocitos gigante con

núcleos hiperlobulados. Una muestra de médula ósea al diagnóstico también proporciona una referencia útil para hacer comparaciones posteriores por ejemplo en relación a la transformación mielofibrótica. La segunda diferencia, BCSH no utiliza la histología de médula ósea para subdividir TE en "TE verdadera" y "mielofibrosis prefibrótica" porque la existencia de este último como una entidad distinta sigue siendo polémica y los criterios histológicos son difíciles de reproducir [161]. En tercer lugar, la clasificación BCSH incluye en el diagnóstico de TE a pacientes con reticulina en médula ósea mayor de grado 2 (en una escala de 0-4) que carecen de otras características de transformación mielofibrótica. Bajo los criterios de la OMS, estos pacientes no podrían ser clasificados como TE, porque tienen mucha reticulina, o MFP, ya que no tienen ninguna de las características clínicas necesarias para el diagnóstico, y entrarían en el grupo de NMPC inclasificables.

La distinción entre TE y PV es, en teoría, sencilla. Los pacientes con PV tienen una eritrocitosis manifiesta que no existe en ET. Por desgracia, en la práctica la situación es más compleja. La creciente evidencia demuestra que los pacientes con TE JAK2V617F positiva representan una forma latente de PV con características clínicas principales similares [46, 175]. Ha habido un considerable debate sobre dónde trazar la línea entre ellos. De hecho, hay problemas inherentes en el uso de las variables continuas, como la hemoglobina, hematocrito, o masa de glóbulos rojos, para hacer esta distinción entre estas dos entidades, ya que el grupo de pacientes con los valores en el límite, inevitablemente, incluyen ambos trastornos. El diagnóstico de PV basado en la presencia de la mutación V617F en el gen *JAK2* y un hematocrito elevado (con o sin funciones de apoyo como una eritropoyetina baja en suero), está contemplado en las guías de la OMS y BCSH. Se ha demostrado que, a menos que marcadamente elevados, el hematocrito no predice de manera precisa un aumento de la masa de glóbulos rojos

[176], que los niveles séricos de eritropoyetina no distinguen PV de ET [46] y que los pacientes con TE, sobre todo aquellos JAK2V617F positivos, pueden tener masa eritroide normal a pesar de un hematocrito alto [177]. Sin embargo, en presencia de un hematocrito normal y reservas normales de hierro, la importancia clínica de la masa eritroide no está clara, por lo que en la práctica clínica rutinaria no se determina la masa eritroide en pacientes diagnosticados de TE. Es probable que una mejor comprensión de su patogenia molecular nos permita seguir avanzando en la distinción TE de PV.

### **3.1.2.-Trombocitemia Esencial vs Mielofibrosis Primaria.**

Se cuestiona la existencia de distintos subgrupos dentro del diagnóstico de TE dado su heterogeneidad en cuanto a las características clínicas, analíticas e histológicas al diagnóstico. En parte, la heterogeneidad clínica es reflejo de la presencia o ausencia de mutaciones en *JAK2* o *MPL* [46, 161, 178] e incluso, las diferencias genéticas constitucionales. La actual clasificación de la OMS propone que la histología de médula ósea pueda ser utilizada como una herramienta para subdividir TE en los llamados "TE verdaderos" y "mielofibrosis prefibrótica" [86] y sugiere que la verdadera TE es una condición benigna y estable mientras que la mielofibrosis prefibrótica progresa clínicamente a una mielofibrosis clínica [179]. Sin embargo muchos de los criterios histológicos para definir la mielofibrosis prefibrótica, tales como la morfología de los megacariocitos, son subjetivos y difíciles de aplicar de forma reproducible, incluso por patólogos experimentados [161]. Por lo tanto, se ha de tratar evitar los términos de TE verdadera y mielofibrosis prefibrótica en nuestra práctica. Una segunda área de debate se refiere a los pacientes con trombocitosis aislada que muestran un aumento de la fibrosis reticulínica de la médula ósea al momento del diagnóstico, pero carecen de

cualquier otra característica de MFP [86]. Estos pacientes tienen un diagnóstico claro de NMPC, pero no puede clasificarse como TE o PMF, según los criterios de la OMS. De acuerdo con los datos del ensayo PT-1, es importante destacar que estos casos no son raros, y en un 15% a 20% de los pacientes con TE presentan fibrosis reticulínica al momento del diagnóstico grado 3 o de vez en cuando grado 4 (en una escala de 0-4, con el grado 4 indica la presencia de fibrosis colágena), en ausencia de otras características de MFP [180]. Es cierto que un aumento de fibrosis en médula ósea en el diagnóstico se asocia con mayor tasa de transformación mielofibrótica, trombosis y hemorragia pero sin cambios en la supervivencia general [180]. La falta de una diferencia en la supervivencia, junto con el escaso número de complicaciones incluso en los niveles de reticulina elevados, apoya el concepto de que los pacientes que presentan una trombocitosis aislada pero con elevada reticulina tienen un pronóstico relativamente benigno. Por lo tanto, se siguen las pautas de BCSH según la cual este tipo de pacientes son diagnosticados y tratados como TE. Una tercera área de controversia es la validez de la visión tradicional de la TE y MFP como entidades separadas. Más recientemente se ha sugerido que los MFP representan una fase acelerada de una NMPC sin diagnóstico previo, por lo general TE [87, 161, 175]. Este concepto es apoyado por varias líneas de evidencia: (1) MFP es clínicamente indistinguible de la transformación mielofibrótica de la TE, (2) la prevalencia de las mutaciones en *JAK2* y *MPL* son similares en TE y MFP, (3) la citogenética y la cinética de la enfermedad sugieren que la MFP representa la fase acelerada de la enfermedad, y (4) los pacientes con MFP pueden haber cursado con trombocitosis durante muchos años antes de ser diagnosticados [86]. Se ha descrito que los pacientes con TE que se presentan con un recuento de plaquetas ligeramente elevadas pueden representar las fases iniciales de la enfermedad de MFP o fase tardía cuando aparece trombopenia. Estas numerosas

controversias sobre los límites entre la TE y MFP es probable que estén resueltos en el tiempo a medida que se tenga un mayor conocimiento de la biología molecular en estos trastornos. Algunos estudios consideran que los criterios de la OMS enfatizan los criterios histológicos en ocasiones subjetivos, lo que implica una falta de comparabilidad entre los grupos de pacientes [86]. Por el contrario, la definición más amplia del ET aprobada por BCSH tiene la ventaja de que es más fácil de aplicar.

### **3.1.3.-Diagnóstico de PV.**

Cuando existe una sospecha clínica de PV, las pruebas que se deben solicitar son los niveles séricos de Epo, fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG) pero no de forma sistemática la masa eritroide (Figura 12) [181].

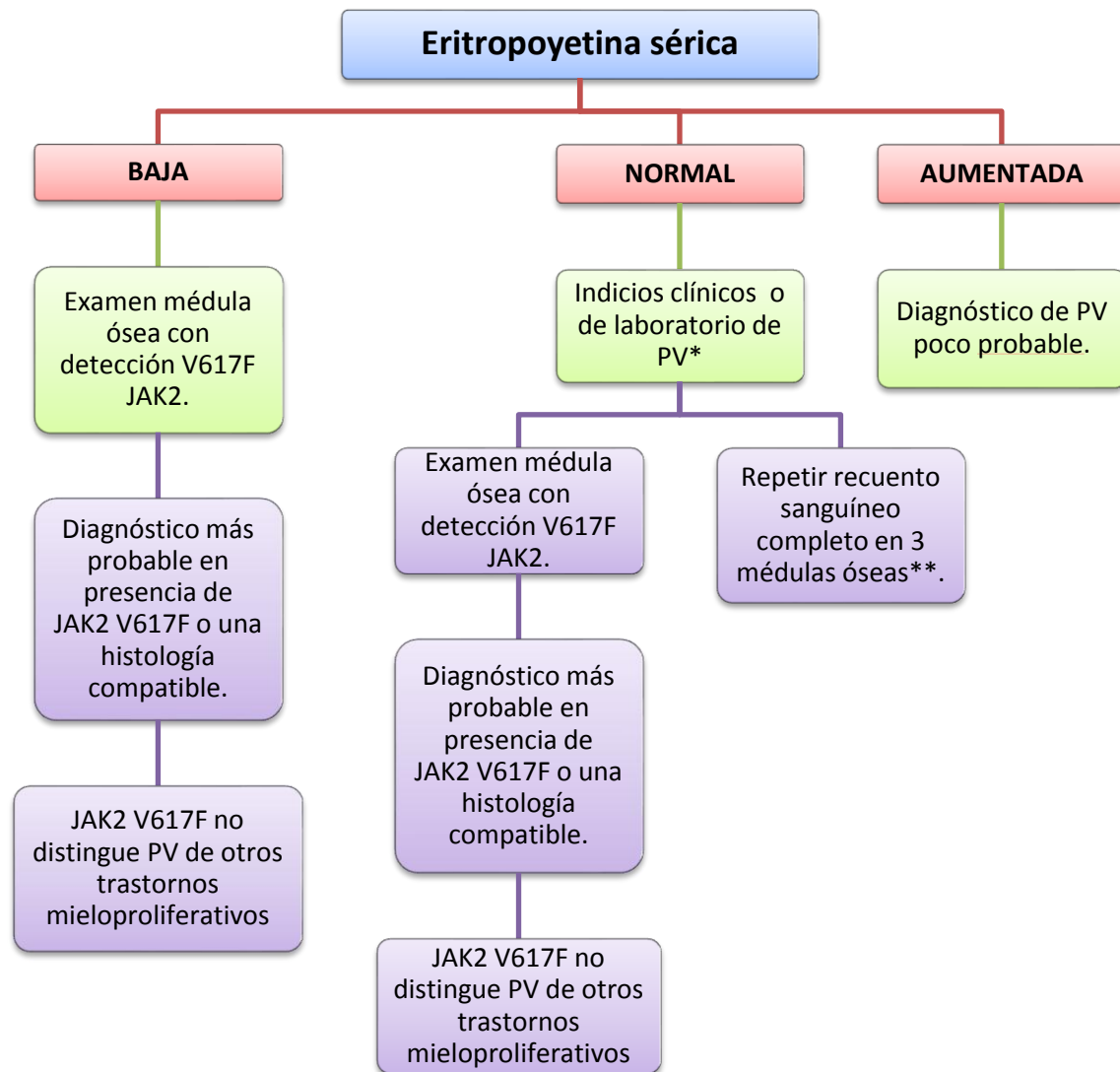


Figura 12: Algoritmo diagnóstico de PV (1) (adaptado de Tefferi *et al.*, 2005). \*Los indicios clínicos de PV incluyen esplenomegalia, trombosis, prurito acuagénico y eritromelalgia. Indicios de laboratorio para PV son trombocitosis, leucocitosis y aumento en la puntuación de fosfatasa alcalina leucocitaria. \*\* Como alternativa, se puede considerar la detección de mutaciones de JAK2V617F para ayudar a decidir la necesidad de un examen de médula ósea.

Esto se debe a que la masa eritroide no distingue entre PV y policitemia secundaria, y la historia clínica del paciente y los datos analíticos son la clave para el diagnóstico diferencial. El valor de la masa eritroide en el diagnóstico de PV se ha investigado en un reciente estudio donde se ha podido demostrar que esta prueba está infravalorada por muchos países [182], ya que más del 80% de los hematólogos rara vez o nunca miden masa eritroide para el diagnóstico de PV [183]. Una vez que los resultados de los

niveles séricos de Epo están disponibles, una evaluación adicional para completar el diagnóstico de PV sólo se justifica si el nivel de sérico de Epo es bajo o normal, porque el diagnóstico de PV es muy poco probable en presencia de un aumento de Epo en suero [71, 181] En aquellos casos de epo baja, se recomienda proceder directamente al estudio de médula ósea debido a la alta probabilidad de diagnóstico de PV. Hay raros casos de policitemia congénita que se asocian con un bajo nivel sérico Epo [184]. Por el contrario, en presencia de un nivel normal de Epo, el examen de médula ósea, sólo se recomienda si la fosfatasa alcalina leucocitaria está elevada o el paciente manifiesta alguna de las características específicas de PV. En líneas generales, es controvertida la utilidad del estudio de la médula ósea en el diagnóstico de PV, y por el contrario la detección de mutaciones JAK2 adquiere mayor relevancia en el diagnóstico de PV (Figura 13) [181].



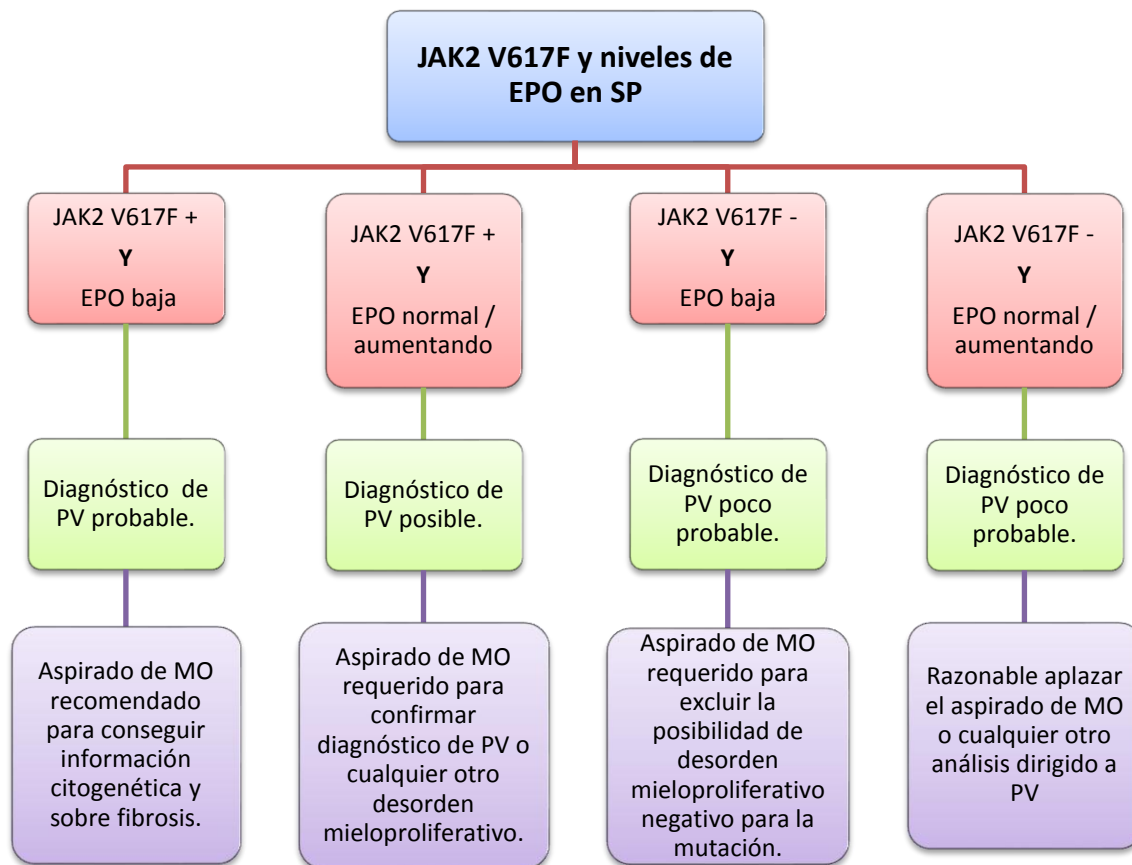


Figura 13: Algoritmo diagnóstico de PV (2) (adaptado de Tefferi *et al.*, 2005). SP, Sangre Periférica; EPO, Eritropoyetina.

No hay que olvidar que la detección de V617F no puede sustituir al estudio histológico de la médula ósea, porque JAK2V617F no siempre se detecta en PV [134],[136]. Sin embargo, en los pacientes asintomáticos con un nivel sérico normal de EPO sin evidencia de características sugestivas de PV, se puede considerar la detección de la mutación V617F para decidir la no realización de la biopsia de médula. Además algunos autores consideran no necesario el estudio de médula si los niveles de epo bajos se acompañan de la detección de la mutación V617F en el gen JAK2 en la sangre periférica [181]. Otros autores lo consideran necesario para el estudio de la fibrosis y análisis de cariotipo [185]. Además, el análisis citogenético puede identificar marcadores moleculares relevantes que podría dar información acerca de mecanismos patogénicos adicionales y facilitar el diagnóstico diferencial entre las subcategorías de NMPC. Finalmente, la asociación muy estrecha entre PV y JAK2V617F ha limitado el

uso de la masa eritroide y marcadores biológicos [186]. Los marcadores biológicos y moleculares incluyen formación de colonias eritroides [187], expresión del receptor de trombopoyetina en megacariocitos (c-mpl) [188] y del *PRV-1* (*Polycythemia Rubra Vera receptor-1*) [189] y nivel de serotonina en plasma rico en plaquetas [190, 191]. Obviamente, la viabilidad de estas pruebas en la práctica clínica habitual, requiere la disponibilidad de pruebas de laboratorio no siempre factible.

### **3.1.4.-Diagnóstico de mielofibrosis.**

El diagnóstico actual de la MFP está basada en criterios de la OMS e incluye características morfológicas, clínicas, citogenéticas y moleculares [20, 148].

El diagnóstico de la MF post-PV o post-ET es de acuerdo a criterios del GTI-MRT (Tabla 10) [7, 192, 193].

Tabla 10: Criterios diagnósticos recomendados por IWG-MRT (*The International Working Group for MPN Research and Treatment*) para el diagnóstico de la mielofibrosis post-PV y mielofibrosis post-TE

<p><b>Criterios para la mielofibrosis post-policitemia vera:</b></p> <p><b>Criterios requeridos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La documentación de un diagnóstico previo de policitemia vera definido según los criterios de la OMS.</li> <li>• Fibrosis de médula ósea de grado 2-3 (en una escala 0-3) o de grado 3-4 (en una escala 0-4)*</li> </ul> <p><b>Criterios adicionales (se requieren dos):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia o pérdida sostenida de la necesidad de flebotomía en la ausencia de terapia citorreductora.</li> <li>• Una imagen leucoeritroblástica de sangre periférica.</li> <li>• Aumento de la esplenomegalia definida como un aumento de la esplenomegalia palpable <math>\geq</math> 5 cm (distancia de la punta del bazo del margen costal izquierdo) o aparición de una nueva esplenomegalia palpable.</li> <li>• Desarrollo de uno o más de los tres síntomas constitucionales: pérdida de peso <math>&gt; 10\%</math> en 6 meses, sudores nocturnos, fiebre de origen desconocido (<math>&gt; 37.5^{\circ}\text{C}</math>)</li> </ul>
<p><b>Criterios para la mielofibrosis post-trombocitemia esencial</b></p> <p><b>Criterios requeridos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La documentación de un diagnóstico previo de trombocitemia esencial según los criterios de la OMS.</li> <li>• Fibrosis de médula ósea de grado 2-3 (en una escala 0-3) o de grado 3-4 (en una escala 0-4)*</li> </ul> <p><b>Criterios adicionales (se requieren dos):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia y una disminución <math>\geq 2</math> g/dl del nivel basal de hemoglobina.</li> <li>• Una imagen leucoeritroblástica de sangre periférica.</li> <li>• Aumento de la esplenomegalia definida como un aumento de la esplenomegalia palpable <math>\geq</math> 5 cm (distancia de la punta del bazo del margen costal izquierdo) o aparición de una nueva esplenomegalia palpable.</li> <li>• El aumento de lactato deshidrogenasa</li> <li>• Desarrollo de uno o más de los tres síntomas constitucionales: pérdida de peso <math>&gt; 10\%</math> en 6 meses, sudores nocturnos, fiebre de origen desconocido (<math>&gt; 37.5^{\circ}\text{C}</math>)</li> </ul>

\*Grado 2-3 según la clasificación europea: red difusa, a menudo de fibra gruesa, sin evidencia de colagenización (tinción tricrómica negativo) o difusa, red de fibra gruesa con áreas de colagenización (tinción tricrómica positiva). Grado 3-4 según la clasificación estándar: aumento difuso y denso en reticulina con intersecciones extensas, a veces con sólo haces focales de colágeno y/o osteosclerosis localizadas o aumento difuso y denso de reticulina con amplias intersecciones con haces secundarios de colágeno, a menudo asociada con osteosclerosis significativa.

En las 3 variantes de MF, las características típicas de laboratorio incluyen anemia (microcítica en el 28% de los casos de MFP) [194], leucoeritroblastosis en sangre periférica, dacriocitosis, leucocitosis, trombocitosis/trombopenia, aumento de lactato deshidrogenasa (LDH), exceso de blastos circulantes o células CD34. La presencia de

leucoeritroblastos en sangre periférica es típica pero no específica de MFP y no existe en la fase prefibrótica de MFP [195]. En el estudio de médula ósea se objetiva fibrosis, osteosclerosis, y angiogénesis. Cuando la fibrosis de la médula está ausente (es decir, MFP prefibrótica) y, además existe trombocitosis, se hace un diagnóstico falso de la TE. La posibilidad de MFP prefibrótica, a diferencia de TE, se debe considerar en presencia de aumento persistente de LDH en suero, anemia, leucoeritroblastosis, el aumento de células CD34 circulantes y marcada esplenomegalia [196]. Además un exhaustivo examen morfológico de la médula ósea es necesario para distinguir las dos entidades. Los megacariocitos en TE son grandes y maduros, mientras que los que aparecen en MF en fase prefibrótica presentan una maduración anormal con los núcleos hipercromáticos e irregularmente plegado [197]. Hay que destacar que la distinción entre la TE y MFP prefibrótica es clínicamente relevante debido a que tanto la supervivencia global como la supervivencia libre de leucemia son significativamente inferiores en la fase prefibrótica [196]. Sin embargo, actualmente no hay evidencia para sugerir una diferente enfoque de tratamiento diferente para los pacientes con MFP prefibrótica y TE. El diagnóstico diferencial de MFP también incluye la fibrosis asociada con neoplasias no neoplásicas o de otro tipo de condiciones, entre ellas el cáncer metastásico, neoplasias linfoides u otra neoplasia mieloide, especialmente LMC, SMD, leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) o LMA. La presencia de una mutación en *JAK2* o *MPL* (70% una u otra) excluye de forma fiable la fibrosis reactiva en la médula ósea [178]. La presencia de micro megacariocitos plantea la posibilidad de la LMC y deben llevarse a cabo pruebas citogenéticas o moleculares de detección del transcrito *BCR-ABL*. El Síndrome mielodisplásico o LMMC se debe considerar en presencia de diseritropoyesis/disgranulopoyesis o de monocitosis en sangre periférica respectivamente [198, 199]. En este sentido, la presencia de la anormalidad citogenética

como la delección del 9q o 13q apoya el diagnóstico de MFP [200, 201]. Por el contrario, JAK2V617F puede ocurrir tanto en SMD y LMMC, aunque con poca frecuencia [202], y por lo tanto no es muy útil en distinguir una neoplasia mieloide de otra. Los pacientes que cumplen criterios de diagnóstico para PV debe ser etiquetado como "PV", incluso cuando presentan importante fibrosis en médula ósea [148] y trombocitosis. Los pacientes con mielofibrosis aguda (ya sea panmielosis aguda con mielofibrosis aguda o leucemia megacarioblástica) generalmente se presentan con graves síntomas constitucionales, pancitopenia, esplenomegalia moderada o no, y el aumento de blastos circulantes [199]. Por lo general estos casos no deben ser manejados como LMA, independientemente de término que se utiliza para describirlos.

### **3.2.- Pronóstico (estratificación).**

#### **3.2.1.-Policitemia Vera y Trombocitemia esencial.**

En la PV se ha descrito un 25% de muertes debidas a complicaciones cardiovasculares (trombosis/sangrado) y un 6% debido a leucemia aguda. Los factores predictivos de resultados adversos: factores de riesgo cardiovascular (FRCV), edad > 60-65 años, historia previa de trombosis y el uso de agentes alquilantes. No se ha asociado a efectos adversos: mielofibrosis, anormalidades citogenéticas y la trombocitosis.

En relación a la TE, Cortelazzo *et cols.* describieron un riesgo anual de 6,6% de complicaciones trombóticas para los pacientes diagnosticados de TE con más de  $1 \times 10^9$  plaquetas o historia de trombosis [54]. Varios estudios han determinado que el conteo leucocitario se correlaciona mejor que el conteo plaquetario con el riesgo de trombosis [203, 204].

#### **3.2.2.-Mielofibrosis (estratificación)**

En 2009 se consolidó un modelo pronóstico en MFP con el desarrollo del *score* IPSS (*International Prognostic Scoring System*) [193]. El IPSS para MFP es aplicable a pacientes que están siendo evaluados en el momento del diagnóstico inicial y utiliza cinco predictores independientes de una supervivencia menor: edad > 65 años, la hemoglobina <10 g/dl, recuento de leucocitos > 25x10<sup>9</sup> / L, blastos circulantes >1%, y la presencia de síntomas constitucionales [193]. La presencia de 0, 1, 2 y 3 factores adversos define respectivamente riesgo bajo, intermedio-1, intermedio-2, y las enfermedades de alto riesgo. La mediana de supervivencia correspondientes fueron de 11.3, 7.9, 4 y 2.3 años (Figura 14) [193].

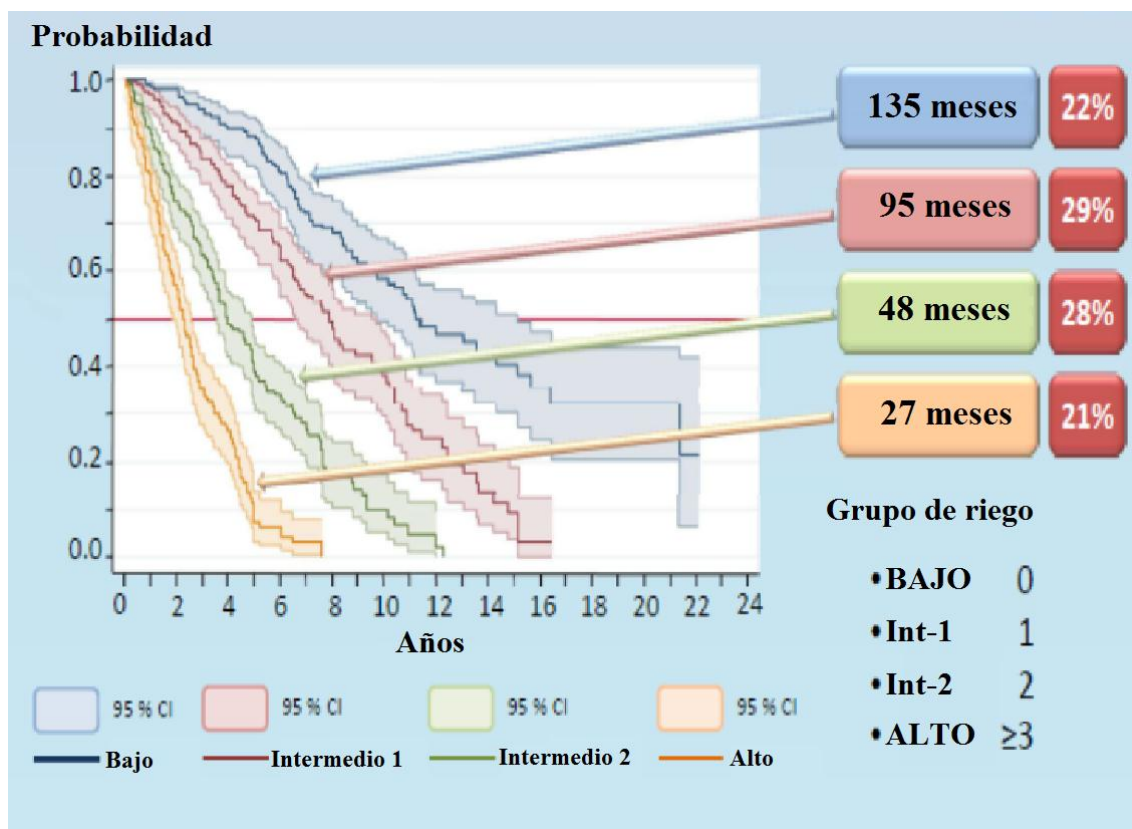


Figura 14: Curva de supervivencia de los pacientes diagnosticados de mielofibrosis de acuerdo con IPSS. (traducido de Cervantes *et al.*, 2009).

El GTI-MRT desarrolló posteriormente un modelo pronóstico dinámico, el DIPSS (*Dynamic International Prognostic Scoring System*) que utiliza las mismas variables

pronósticas utilizadas en el IPSS, pero que se puede aplicar en cualquier momento durante el curso de la enfermedad [76]. El índice DIPSS asigna dos puntos negativos, en lugar de uno, si la hemoglobina  $<10$  g / dl y el riesgo se modifica en consecuencia: baja (0 puntos negativos), intermedio-1 (1 o 2 puntos), intermedio-2 (3 ó 4 puntos) y alto (5 o 6 puntos) (Figura 15) [76].

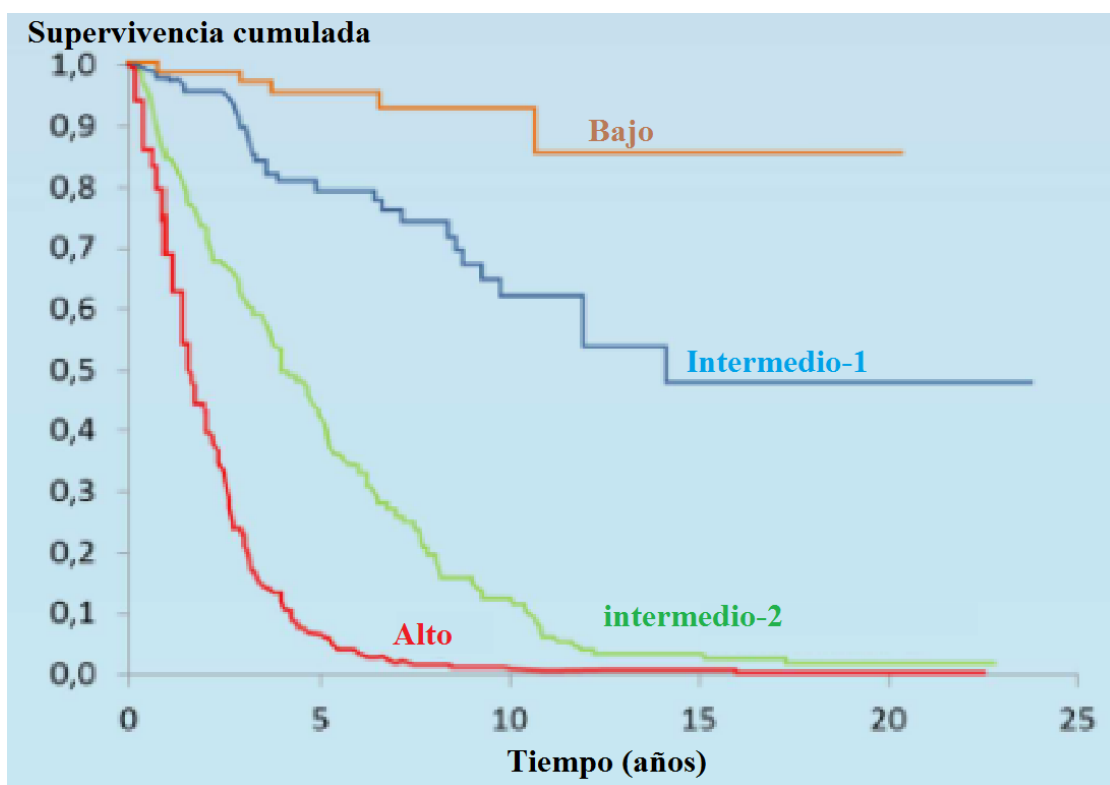


Figura 15: Curvas de supervivencia actual de los 4 grupos de pacientes de riesgo de acuerdo al nuevo sistema de pronóstico de MFP. (traducido de Passamonti *et al.*, 2008)

Más recientemente, independientemente de los factores de riesgo para la supervivencia incluidos en IPSS y DIPSS se identificaron, y también se incluyeron, cariotipo desfavorable (es decir, cariotipo complejo o anomalías que incluyen -8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p, o reordenamiento 11q23 [205, 206], necesidad de transfusión de glóbulos rojos [207, 208] y recuento de plaquetas  $<100 \times 10^9/L$  [209]. En consecuencia,

DIPSS fue modificada recientemente en DIPSS-plus mediante la incorporación de estos tres factores de riesgo adicionales [210]. La tabla 11 resume los modelos pronósticos actuales para la mielofibrosis.

Tabla 11: Modelos pronósticos actuales para la MFP.

Variable	IPSS	DIPSS	DIPSS-plus
Edad > 65 y	X	X	X
Síntomas constitucionales	X	X	X
Hemoglobina < 10g/dL	X	X	X
Leucocitos > 25x10 <sup>9</sup> /L	X	X	X
Blastos circulantes ≥ 1%	X	X	X
Plaquetas < 100x10 <sup>9</sup> /L			X
Transfusión necesaria de hematíes			X
Cariotipo no favorable +8,-7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, reordenamiento 11q23.			X
	1 punto por cada	1 punto por cada excepto Hb =2	1 punto por cada

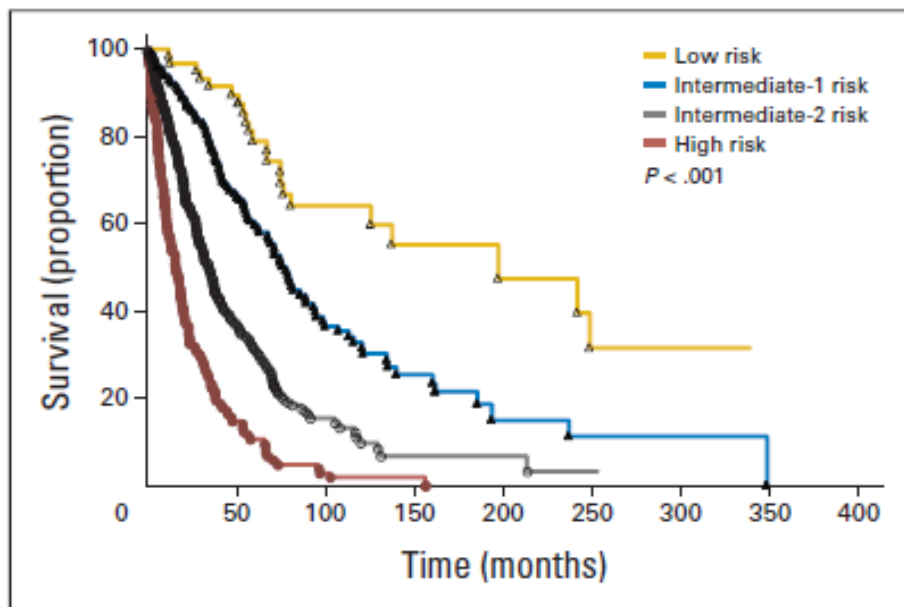


Figura 16: Supervivencia de 793 pacientes diagnosticados en la Clínica Mayo de MFP y estratificados de acuerdo con score DIPSS, cariotipo, conteo de plaquetas y estado transfusional.



De acuerdo con DIPPS-plus los pacientes fueron incluidos en bajo riesgo (sin factores de riesgo), intermedio-1 (un factor de riesgo), intermedio-2 (dos o tres factores de riesgo), y alto (cuatro o más factores de riesgo) con una mediana de supervivencia respectiva de 15.4, 6.5, 2.9 y 1.3 años (Figura 16) [210].

Tabla 12. Estratificación del riesgo y terapia adaptada al riesgo en mielofibrosis primaria (traducido de Gangat *et al.*, 2011)

Grupos de riesgo MFP en DIPSS-Plus	Supervivencia mediana (años)	Gestión de MFP
De bajo riesgo (sin factores de riesgo *)	~15,4	Observación o fármacos convencionales **
Riesgo Intermedio-1 (factor de riesgo 1*)	~6,5	Observación, fármacos convencionales ** o experimentales
Riesgo Intermedio-2 (factores de riesgo 2 o 3*)	~2,9	Trasplante alogénico o fármacos experimentales
Alto riesgo (factor de riesgo 4*)	~1,3	Trasplante alogénico o fármacos experimentales

DIPSS, Sistema internacional de puntuación pronóstica dinámica. \*DIPSS-plus utiliza 8 factores de riesgo para supervivencia inferior. \*\* Andrógenos preparados o talidomida con prednisona para la anemia, hidroxiurea para esplenomegalia sintomática.

Por otra parte, la mortalidad a los dos años fue > 80% en presencia de cariotipo monosómico, inv(3)/i(17q), blastos circulantes > 9%, leucocitos  $\geq 40 \times 10^9/L$  o cariotipo desfavorable [211]. Los pacientes estratificados en un "riesgo muy alto", se ha de considerar de forma inmediata para trasplante alogénico de células madre (ASCT) (Tabla 12) [20],[211]. Los datos más recientes indican una supervivencia inferior en MFP asociada con haplotipo de JAK2 46/1 [18], baja carga alélica JAK2V617F [212, 213] o la presencia de mutación en los genes *IDH* [214] o *EZH2* [215]. Por el contrario, la presencia o ausencia de las mutaciones en *JAK2* [212, 213], *MPL*[216] o *TET2*[217] no parecen afectar a la supervivencia. Sin embargo, son necesarios más estudios para descifrar el efecto de las mutaciones asociadas a NMPC en la MFP. El aumento de los niveles plasmáticos de IL-8, IL-10, IL-15 o IL-2R se ha asociado recientemente con

pobres supervivencias que no se explican por la categorización de riesgo convencional [218].

Los factores de riesgo para la supervivencia libre de leucemia incluyen >3% de blastos circulantes, recuento de plaquetas  $<100 \times 10^9/L$ , y la presencia de cariotipo desfavorable [219, 220]. Aunque ha sido demostrado que DIPSS predice la supervivencia libre de leucemia, en un estudio de más 793 pacientes con PMF[204], sólo hay dos factores de riesgo para transformación leucémica que son el cariotipo desfavorable y recuento de plaquetas  $<100 \times 10^9/L$  [210]. El riesgo de transformación leucémica a los 10 años fue del 12% en ausencia de estos dos factores de riesgo y 31% en la presencia de uno o de ambos factores de riesgo.

### **3.2.3.-Importancia de la carga alélica en el pronóstico.**

Actualmente un número limitado de estudios con más de 100 pacientes han estudiado la importancia pronóstica de JAK2V617F en las NMPC.

Riesgo de trombosis: el estudio más relevante en la TE (n = 806) sugiere que la presencia de JAK2V617F se asocia con trombosis venosa [46], del mismo modo una mayor prevalencia de episodios tromboticos arteriales se ha informado en pacientes diagnosticados de MF JAK2V617F positivos [221]. Sin embargo, el riesgo global de trombosis no fue afectada por la presencia de la mutación en dos estudios relativamente grandes en TE y otro estudio en MF ( n=15037 y n=13.013) [222]. Es posible que la edad mayor [46, 221, 223], alto nivel de hematocrito [46, 51, 223], leucocitos [46, 51, 222-224] así como la carga alélica en pacientes JAK2V617F positivos hayan contribuido a la aparente asociación entre trombosis y JAK2 en algunos estudios. Sería cuestionable si el diagnóstico erróneo de TE JAK2V617F positivo en pacientes con PV fuese un posible factor de confusión. En PV, debido al pequeño número de casos

descritos como JAK2V617F negativos, la comparación válida entre casos positivos y negativos no es posible.

Transformación a PV en TE: Diversos estudios sugieren una asociación fuerte entre la detección de la mutación V617F en pacientes diagnosticados de ET y el riesgo de progresión a la policitemia [46, 223].

Transformación a mielofibrosis en PV: un estudio ha sugerido un mayor nivel de hemoglobina y un mayor riesgo de transformación fibrótica en pacientes diagnosticados de PV con alta carga alélica [225]. Sin embargo, la validez de esta última asociación es cuestionable por el aumento demostrado de la carga alélica en el tiempo en algunos pacientes con PV [221].

Transformación a mielofibrosis en TE:

La relación entre la presencia de la mutación y la transformación a MF en TE no ha sido confirmada [46, 223].

Transformación a leucemia aguda en mielofibrosis: La relación entre la presencia de la mutación y, la transformación blástica en MF no fue confirmada [226].

Supervivencia global: En términos de supervivencia, dos grandes estudios de la Clínica Mayo, uno en TE (n=150; mediana de seguimiento 132 meses) [223] y el otro en MF (n=117; mediana de seguimiento ~ 37 meses) [221], no han identificado el estado mutacional JAK2V617F positivo como un factor pronóstico independiente [221, 223]. Por el contrario, otro estudio multicéntrico desarrollado en Europa [222], informó inferior supervivencia, posiblemente vinculado a un mayor riesgo de transformación leucémica, en pacientes diagnosticados de MF con mutación V617F positiva (n=152; mediana de seguimiento, 38 meses). La relación entre la carga alélica JAK2V617F y el pronóstico en la MFP, no está del todo claro, ya que los hallazgos que han sido

reportados son controvertidos [46]. Mientras que hay estudios [46, 155] que informan que la positividad de JAK2V617F se asocia con una peor supervivencia global, los estudios de otros grupos [212, 213, 221] no corroboraron estos hallazgos. En estos últimos estudios, los pacientes MFP fueron divididos en cuatro grupos (V617F-negativos y V617F positivos con cuartiles bajos, medios y altos de la carga de alelo mutante). Curiosamente, entre todos los grupos, los pacientes en el cuartil más bajo de JAK2 V617F tenían una supervivencia significativamente peor en general [212, 213, 221].

Sigue siendo controvertido la asociación de la mutación V617F o la alta carga alélica con la supervivencia [222, 227] o el riesgo de transformación a MF y leucemia [46, 193, 212, 213, 228]. Este hallazgo es un reflejo de la particular complejidad pronóstica de NMPC y son necesarios más estudios prospectivos antes de un cambio en el tratamiento clásico de las NMPC en función del estado mutacional de *JAK2*.

### 3.3.-Tratamiento

La TE y PV son en cierta medida una sola enfermedad dada la posibilidad de transformación de una en otra y la superposición significativa de los niveles de hemoglobina y plaquetas. Estas observaciones ponen en duda la justificación de diferentes estrategias terapéuticas en estos dos trastornos, así como un umbral distinto de nivel de hematocrito y plaquetas. El objetivo principal de la intervención terapéutica tanto en ET como en PV es la prevención de la trombosis. Las estrategias actuales de tratamiento de los pacientes diagnosticados de TE y PV se resumen en la Tabla 13 [158].

Tabla 13 Tratamiento actual de las NMPc (Traducido de Tefferi *et al.*, 2006).

Categorías de riesgo	TE	PV	MF	
			Edad < 50 años	Edad ≥ 50 años
<b>Bajo</b>	Baja dosis de aspirina	Baja dosis de aspirina + flebotomía	Observación o fármacos experimentales.	Observación o fármacos experimentales.
<b>Intermedio</b>	Baja dosis de aspirina*	Baja dosis de aspirina* + flebotomía	Fármacos experimentales o trasplante RIC.	Fármacos experimentales o terapia convencional.
<b>Alto</b>	Baja dosis de aspirina + hidroxiurea	Baja dosis de aspirina + flebotomía + hidroxiurea	Fármacos experimentales o trasplante mieloablatoivo.	Fármacos experimentales o trasplante RIC.

\*La enfermedad de von Willebrand adquirida clínicamente de forma significativa debe ser excluida antes de usar aspirina en pacientes con recuento de plaquetas en  $1000 \times 10^9/L$ . RIC, *Reduced-Intensity Conditioning* (acondicionamiento de intensidad reducida).

En la mielofibrosis, la disponibilidad de un hermano histocompatible, la estabilidad de la enfermedad del paciente y sus deseos para el tratamiento, son factores clave para decidir proceder con el trasplante alogénico de células de forma inmediata o diferida. Sin embargo los inhibidores de JAK2 se encuentran actualmente en distintas fases de evaluación clínica. Se ha demostrado que reducen la esplenomegalia y la sintomatología constitucional.

### 3.4.1.- Indicaciones de inicio de tratamiento citorreductor en TE.

Los principales factores de riesgo establecidos para complicaciones trombóticas en la TE son una edad mayor de 60 años o antecedentes de trombosis previa [43, 54]. Los pacientes con estos factores de riesgo probablemente se beneficiarían de un tratamiento citorreductor [56]. Los factores de riesgo cardiovascular también predicen la trombosis en pacientes diagnosticados de TE [43, 229] aunque no está claro si su presencia requiera inicio de terapia citorreductora en ausencia de TE de alto riesgo (edad > 60 años

o historia de trombosis). El grado de trombocitosis no es un indicador fiable del riesgo de trombosis, de hecho niveles muy altos pueden predecir complicaciones hemorrágicas otras que las trombóticas [43, 47, 53, 230, 231]. En un meta-análisis se ha confirmado un aumento del riesgo de trombosis venosa y arterial en TE V617F positiva en comparación con V617F negativa [168, 232]. Algunos estudios también han sugerido que la carga alélica de JAK2 podría ser de importancia pronóstica en pacientes NMP, aunque los datos en los pacientes con TE es limitado [178]. El aumento del número de leucocitos o el aumento de la fibrosis de médula ósea desde el diagnóstico también son predictores independientes de complicaciones trombóticas [180, 230]. Algunos estudios han estratificado a los pacientes diagnosticados de TE de acuerdo con el riesgo de trombosis (Tabla 14) [86] y recomiendan inicio de terapia citorreductora para todos los pacientes de alto riesgo.

Tabla 14. Estratificación de riesgo de pacientes con TE (Traducido de Beer *et al.*, 2011)

	<b>Sin criterios de alto riesgo</b>	
<b>Alto riesgo</b>	<b>Bajo riesgo</b>	<b>Riesgo intermedio</b>
Edad > 60 años	Edad < 40 años	Edad 40-60 años
Trombosis previa		
Plaquetas $>1500 \times 10^9/L$		

La citorreducción también se considera en los pacientes con antecedentes de hemorragia grave. Las complicaciones microvasculares, como eritromelalgia, generalmente se tratan con el tratamiento antiagregante, y la terapia citorreductora sólo es considerada para los casos refractarios. Aquellos con indicios de enfermedad arterioesclerótica en ausencia de TE de alto riesgo se individualiza la decisión de inicio de tratamiento. Por ejemplo la terapia citorreductora generalmente no se recomienda para un paciente con hipertensión bien controlada, pero si se considera en una persona con diabetes mal

controlada o un fuerte historial familiar de enfermedad arterioesclerótica de reciente aparición.

El papel del número de plaquetas como determinante de inicio de terapia citorreductora sigue siendo discutible. Muchos médicos todavía recomiendan la terapia citorreductora en pacientes con plaquetas  $> 1500 \times 10^9/L$ , aunque puede ser razonable utilizar un mayor umbral en los pacientes más jóvenes.

Por el momento, no hay datos clínicos sobre la utilidad como factores predictivos de riesgo trombótico, de la mutación V617F en el gen JAK2, de la carga alélica, del recuento de leucocitos, y de la fibrosis de médula ósea. Por lo tanto, no se utilizan actualmente estos factores para guiar las decisiones terapéuticas.

Los pacientes sin características de alto riesgo se pueden dividir en bajo riesgo (edad  $<40$  años) y riesgo intermedio (edad 40-60 años). Es poco probable que la terapia citorreductora ofrezca un efecto protector significativo para las personas con bajo riesgo de la enfermedad, en los que el riesgo a priori de la trombosis es bajo. En la actualidad hay pocas pruebas disponibles para guiar las decisiones de tratamiento en el grupo de riesgo bajo [233] o intermedio. El estudio *PT-1* aleatorizó el uso de hidroxycarbamida y aspirina vs aspirina sola en pacientes con riesgo intermedio (Tabla 15) [224].

Tabla 15: Recomendaciones para el manejo de la TE (adaptado de Campell *et al.*, 2005)

Grupo de riesgo	Tratamiento
Todos los pacientes	Control de FRCV
Alto Riesgo	AAS a baja dosis y HU
	2ª línea: INF o anagrelide
Intermedio	AAS a baja dosis
	Considerar HU (FRCV)
Bajo	AAS a baja dosis

FRCV: Factores de riesgo cardiovascular; AAS, antiagregante; HU, Hidroxiurea; INF, interferón.

## 3.4.2.-Elección del agente citorreductor

La hidroxycarbamida (también conocida como hidroxiurea) es el único agente citorreductor que ha demostrado reducir los eventos trombóticos en ensayos controlados aleatorizados [56] y sigue siendo el tratamiento de primera línea para la mayoría de los pacientes que requieren tratamiento citorreductor (Tabla 16) [86]. Es el agente principal para el control de la mieloproliferación en la TE y la PV.

Tabla 16. Tratamiento citorreductor de la TE (traducido de Beer *et al.*, 2011)

Grupo de edad	Primera línea	Segunda línea
<40 años	Interferón	Hidroxycarbamida
		Anagrelida
40-75 años	Hidroxycarbamida	Interferón
		Anagrelida
> 75 años	Hidroxycarbamida	Anagrelida
		Pipobroman
		Busulfán
		Fósforo radiactivo

Las preocupaciones que se han planteado, eran acerca de un posible aumento del riesgo de transformación leucémica con su administración. Los estudios clínicos previos no han dado resultados concluyentes y hasta incluso son contradictorios [93, 234-237]. Además esta cuestión se complica por la inclusión de pacientes que han recibido múltiples agentes citotóxicos, la falta de controles adecuados, la recopilación de datos retrospectivos y los relativamente cortos periodos de seguimiento. El papel mutagénico de hidroxycarbamida se incrementa al asociarse con deleciones de 17p y con el aumento del riesgo de neoplasia en la piel tras su uso prolongado [238]. Se ha descrito una posible actividad clastogénica in vitro [239]. Por el contrario, la hidroxycarbamida no



aparece ser leucemógena en el tratamiento de la enfermedad de las células falciformes [240] y no parece aumentar las tasas de mutación in vivo de células falciformes en pacientes con NMPC [241]. En este momento no hay estudios que demuestren que la hidroxycarbamida como agente único provoque leucemia y, en cualquier caso, el aumento del riesgo no es equiparable con la reducción de las complicaciones trombóticas, porque la trombosis sigue siendo la fuente principal de morbilidad en la TE.

En el caso de la TE de alto riesgo, la eficacia de la hidroxiurea es mayor comparado con la observación [56] y el tratamiento con anagrelide [88]. Sin embargo algunos estudios [242] han demostrado que la dosis de hidroxiurea necesaria para normalizar el recuento de plaquetas, en muchos casos no se puede administrar por neutropenia, anemia o toxicidad no hematológica. Las guías de *European LeukemiaNet* (ELN) elaboraron un conjunto de criterios de consenso para definir resistencia/intolerancia a hidroxiurea [243]. Se define resistencia/intolerancia si la dosis necesaria para controlar la trombocitosis conduce a un recuento de leucocitos menor de  $2,5 \times 10^9/L$ , un nivel de hemoglobina inferior a 10 g/dl, o una toxicidad inaceptable no hematológica como mucocutánea, úlceras en las piernas o la fiebre inducida por hidroxiurea. Por otro lado, la anagrelida reduce el recuento de plaquetas por inhibición de la diferenciación de megacariocitos [244] y actualmente es terapia de segunda línea para pacientes resistentes o intolerantes a la hidroxycarbamida. La terapia combinada con anagrelida e hidroxycarbamida también se ha utilizado con éxito en la práctica clínica en circunstancias en las que solo hidroxycarbamida no ha conseguido controlar el recuento de plaquetas. Anagrelida no afecta a la cantidad de glóbulos blancos, pero la anemia es común [180]. Además un tercio de los pacientes no pueden tolerar anagrelida debido a efectos secundarios, muchos de los cuales son el resultado de su efecto vasodilatador y

acciones inotrópicos positivas, que incluyen palpitaciones y arritmias, retención de líquidos, insuficiencia cardíaca, y dolor de cabeza [245, 246]. El uso de este medicamento requiere especial precaución en pacientes ancianos o con antecedentes de enfermedad cardíaca. A pesar de que la anagrelida no es citotóxica y, por lo tanto, poco propicia a provocar leucemia, el ensayo PT-1 demostró que la anagrelida más aspirina fue inferior a la hidroxycarbamida con aspirina en pacientes con TE de alto riesgo. A pesar del equivalente control de plaquetas, los pacientes tratados con anagrelida experimentaron mayores tasas de trombosis arterial, mayor hemorragia, progresión de la mielofibrosis y eran más propensos a ser intolerantes al tratamiento [88]. En contraste, con hidroxycarbamida, el tratamiento con anagrelida también fue asociado con un aumento de reticulina en la médula ósea [180]. El aumento del riesgo de transformación mielofibrótica asociada con anagrelida se observó tanto en los pacientes V617F-positivos como negativos. La comparación de los pacientes incluidos en los estudios prospectivos PT-1 (comparación de hidroxycarbamida vs anagrelide) [46, 224] y el estudio italiano [56] (hidroxycarbamida vs sin tratamiento citorreductor) sugieren que anagrelida proporciona una protección parcial de trombosis [224]. La reducción de la eficacia de la anagrelida en comparación con hidroxycarbamida en la prevención de la trombosis se limita a aquellos con TE JAK2V617F-positiva, lo que probablemente refleja una mayor sensibilidad de estos pacientes al efecto citorreductor de hidroxycarbamida [46].

Los informes preliminares con los resultados finales de la ANAHYDRET (anagrelida frente a hidroxiurea) en TE muestran que la anagrelida no es inferior a hidroxycarbamida en el tratamiento de TE [86, 247]. Sin embargo, en comparación con el estudio PT-1, el número de pacientes incluidos era pequeño y la duración de seguimiento relativamente corto (539 pacientes-año en comparación con 2653

pacientes-año en el PT-1) [175]. Por tanto, parece muy poco probable que el estudio ANAHYDRET tenga el poder estadístico necesario para detectar las diferencias observadas en el estudio PT-1. Además el diseño del estudio ANAHYDRET parece inadecuado, sobre todo después de la marcada inferioridad documentada por el ensayo PT-1.

Como tratamientos alternativos al anagrelide, se incluye el interferón pegilado 2 $\alpha$  que ha demostrado ser capaz de controlar la trombocitosis, leucocitosis y las complicaciones vasculares, en la trombocitemia esencial (y en la PV) [248]. Además, el interferón pegilado 2 $\alpha$  ha llevado a una reducción de la carga alélica V617F [249] y podría tener capacidad de alterar la historia natural de la enfermedad. Interferón  $\alpha$  recombinante está libre de efectos teratogénicos o de provocar leucemia. Cabe señalar, sin embargo, que el tratamiento con interferón es aún considerado por muchos como experimental, y su uso en la NMPC no está aprobado en Europa o América del Norte. La terapia se asocia a menudo con efectos secundarios significativos, y aunque el interferón pegilado puede ser más conveniente, la toxicidad es similar [249]. En la práctica clínica, el interferón alfa se utiliza para los pacientes jóvenes (por lo general <40 años), para aquellos que desean formar una familia, o para aquellos en los que hidroxycarbamida puede ser inadecuado. Se debe evitar el uso de interferón en los pacientes mayores, que generalmente son menos capaces de tolerar este agente.

Agentes con fósforo radiactivos, y alquilantes tales como busulfán son eficaces en el control el recuento del recuento plaquetario, pero se asocian con un mayor riesgo de progresión a leucemia aguda, especialmente cuando se utiliza de forma secuencial con hidroxycarbamida [234, 235]. Ambos agentes se pueden dar de forma intermitente con largos intervalos entre dosis y puede ser útil en el tratamiento de pacientes de edad avanzada que no pueden asistir de forma regular a control. Pipobroman, un derivado de

piperezina, es efectivo para reducir el recuento de plaquetas en TE, aunque hay poca evidencia directa de prevención de trombosis [250]. Pipobroman es químicamente similar a los agentes alquilantes y se asocia con un mayor riesgo de transformación leucémica cuando se utiliza en el tratamiento a largo plazo de PV [86]. El uso de pipobroman y otros agentes alquilantes parece restringido a pacientes de edad avanzada (generalmente > 75 años), donde se utilizan como segunda o tercera línea para los que son incapaces de tolerar hidroxycarbamida, por ejemplo, debido a que no cicatrizan úlceras en las piernas.

Por otro lado, hay interés creciente en la histona deacetilasa (HDAC), como vorinostat y givinostat [242], en pacientes con TE y PV y se está considerando la posibilidad de terapias combinadas. Sin duda son necesarios estudios adicionales de duración suficiente para permitir la evaluación de la seguridad y eficacia de estos nuevos agentes como alternativa a las estrategias terapéuticas estándar. Además, el impacto en la mejoría de los síntomas constitucionales y los efectos secundarios a largo plazo no reportados hasta la fecha, en comparación con el tratamiento estándar como la hidroxiurea, son importantes, y su evaluación es un componente esencial de futuros estudios.

En los pacientes diagnosticados de mielofibrosis, los nuevos inhibidores de JAK2 han demostrado disminuir la esplenomegalia sintomática y mejorar significativamente los síntomas constitucionales tales como prurito y fatiga.

# OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo: La carga alélica de la mutación V617F en el gen JAK2 está asociada al fenotipo clínico en los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph(-) y puede predecir la aparición de complicaciones vasculares o la transformación a mielofibrosis y leucemia aguda.

Los objetivos de este estudio son:

1. Analizar el impacto clínico de la mutación V617F en el diagnóstico de PV, TE y MFP y su influencia en la toma de decisiones terapéuticas al diagnóstico
2. Analizar la asociación de alta carga alélica JAK2V617F y el estado mutacional homocigoto con el nivel elevado de Hb, leucocitosis y mayor hematopoyesis compatible con el fenotipo clínico de eritrocitosis.
3. Analizar la asociación de baja carga alélica y el estado mutacional heterocigoto con el conteo plaquetario elevado compatible con el fenotipo clínico de trombocitosis.
4. Evaluar la asociación de la mutación V617F en el gen JAK2 con algunas de las siguientes características clínico-evolutivas de los pacientes estudiados, como:
  - a) presencia de esplenomegalia en pacientes diagnosticados de PV, TE y MF secundaria
  - b) aparición de complicaciones trombóticas/hemorrágicas en pacientes diagnosticados de NMPC Ph (-).
  - c) progresión/transformación a mielofibrosis secundaria en pacientes diagnosticados de PV y TE
  - d) progresión/transformación a leucemia aguda en pacientes diagnosticados de mielofibrosis.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 1. Muestras y características de los pacientes.

En el servicio de Hematología del Hospital Universitario La Paz se han diagnosticado desde el año 2005, 204 Neoplasias Mieloproliferativas Ph Negativas según criterios de OMS [251]: 52 Policitemias Vera, 142 Trombocitemias Esencial 10 Mielofibrosis primaria. En los pacientes diagnosticados antes del 2005 (n=24), la mediana de seguimiento es de 132 meses (84-288) y tiempo mediano transcurrido entre el diagnóstico y la determinación de JAK2 es de 35 meses (1-284).

Hemos realizado un estudio observacional retrospectivo en esos pacientes que disponían, en el momento del diagnóstico, de un estudio de detección de la mutación V617F en el gen JAK2. Los criterios del IWG-MRT [252] se aplicaron para definir la transformación a Mielofibrosis post-PV y post-TE y los criterios de la OMS para el diagnóstico de Leucemia Aguda Mieloide (LAM). La estratificación a alto riesgo en PV y TE se realizó si la edad era superior a 60 años y/o existía historia previa de trombosis, y según el “score” IPSS dinámico en MFP [193]. Los 131 pacientes estratificados como de alto riesgo y 22 de 73 de riesgo bajo/intermedio recibieron tratamiento cito reductivo. Los pacientes de riesgo bajo o intermedio solo fueron tratados con citorreductores en caso de leucocitosis progresiva o trombocitosis severa, presencia de síntomas constitucionales y/o incremento del tamaño del bazo. La aspirina a dosis baja fue administrada en todos los casos exceptuando en aquellos en los que existía contraindicación.

Las modificaciones en el tratamiento previo y la realización de biopsias de médula ósea para evaluar la posible progresión de la enfermedad se hicieron de acuerdo con parámetros clínicos, independientemente del valor de la carga alélica en ese momento.



Los síntomas de la enfermedad fueron evaluados de acuerdo con el protocolo MPN-SAF (*Myeloproliferative Neoplasma Symptom Assessment Form*)[253]. La presencia y grado de fibrosis medular se evaluó en muestras de parafina obtenidas con impregnación de plata de gomori. Se aplicaron los criterios de respuesta al tratamiento de acuerdo con la *European LeukemiaNet* [254], la IWG-MRT [252] y la *European Myelofibrosis Network (EUMNET)* [255] para los pacientes diagnosticados de PV/TE y MF, respectivamente. Este estudio fue aprobado por el comité ético institucional. Los procedimientos seguidos estuvieron en concordancia con la declaración de Helsinki de 1975, revisado en 2000, y los datos clínicos recogidos de acuerdo con los protocolos de nuestro centro de acceso a las historias clínicas. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado previamente a la realización del estudio.

## 2. Análisis de la carga alélica.

El estudio de la carga alélica fue evaluado en polimorfo nucleares de sangre periférica mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real [256].

La presencia de la mutación activadora V617F en el gen *JAK2* se determinó empleando el kit comercial desarrollado por IPSOGEN, *JAK2 MutaQuant™ Kit*. Este ensayo explota la tecnología de PCR cuantitativa a tiempo real (RQ-PCR) y el principio de discriminación alélica mediante sondas TaqMan. Utilizando 2 cebadores específicos (directo y reverso), se amplifica la región de *JAK2* que contiene la mutación V617F. En la mezcla de reacción está presente una sonda oligonucleotídica que se unirá durante la amplificación, bien a la secuencia nativa, bien a la secuencia donde está presente la mutación. Estas sondas al estar marcadas con 1 fluoróforo (FAM<sup>TM</sup>) permite detectar en tiempo real la amplificación de cada alelo (Figuras 17B y 18B), ya que la hidrólisis de

esas sondas, y por lo tanto la emisión de fluorescencia, ocurre sólo si la sonda es totalmente complementaria de la secuencia diana presente en la muestra. En caso de complementariedad parcial, en vez de hidrolizarla, la polimerasa desplaza la sonda evitando así amplificaciones inespecíficas. De este modo, la fluorescencia emitida durante la amplificación apunta directamente al alelo presente en la muestra analizada.

El kit incluye controles de amplificación que aseguran que la cantidad y calidad del DNA a analizar es adecuado para generar un resultado robusto así como controles positivos y negativos de la presencia de la mutación V617F en el gen *JAK2* (Figuras 17A y 18A).

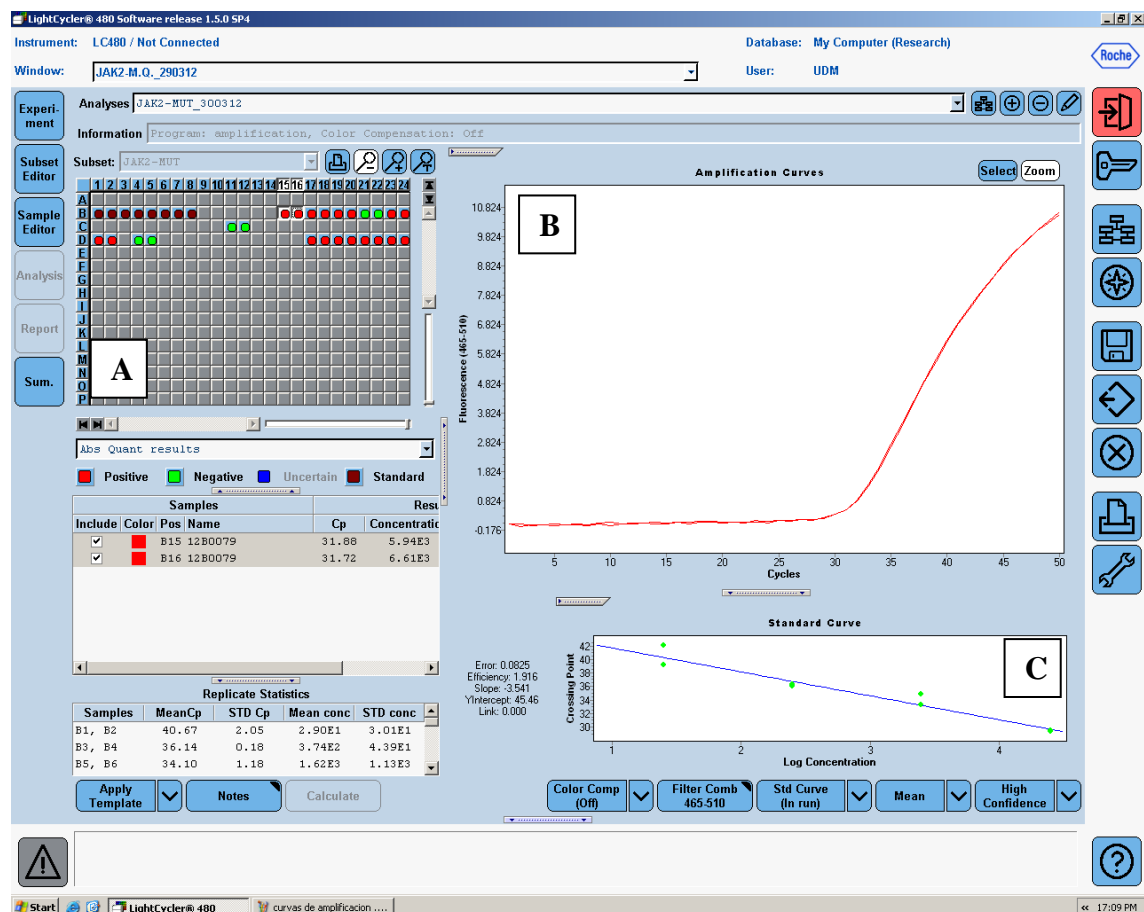


Figura 17: Análisis JAK mutado. a.- Disposición en la placa de 384 pocillos del control positivo para la mutación V617F (D1, D2), del control negativo (D4, D5), de los controles de contaminación (C11, C12) de los patrones de dilución (B1 a B8) y de las muestras de ADN a estudio (desde columna 15 en adelante); b.-Curva de amplificación con una muestra en la que JAK2 está mutado; c.-Recta patrón para el JAK V617F.

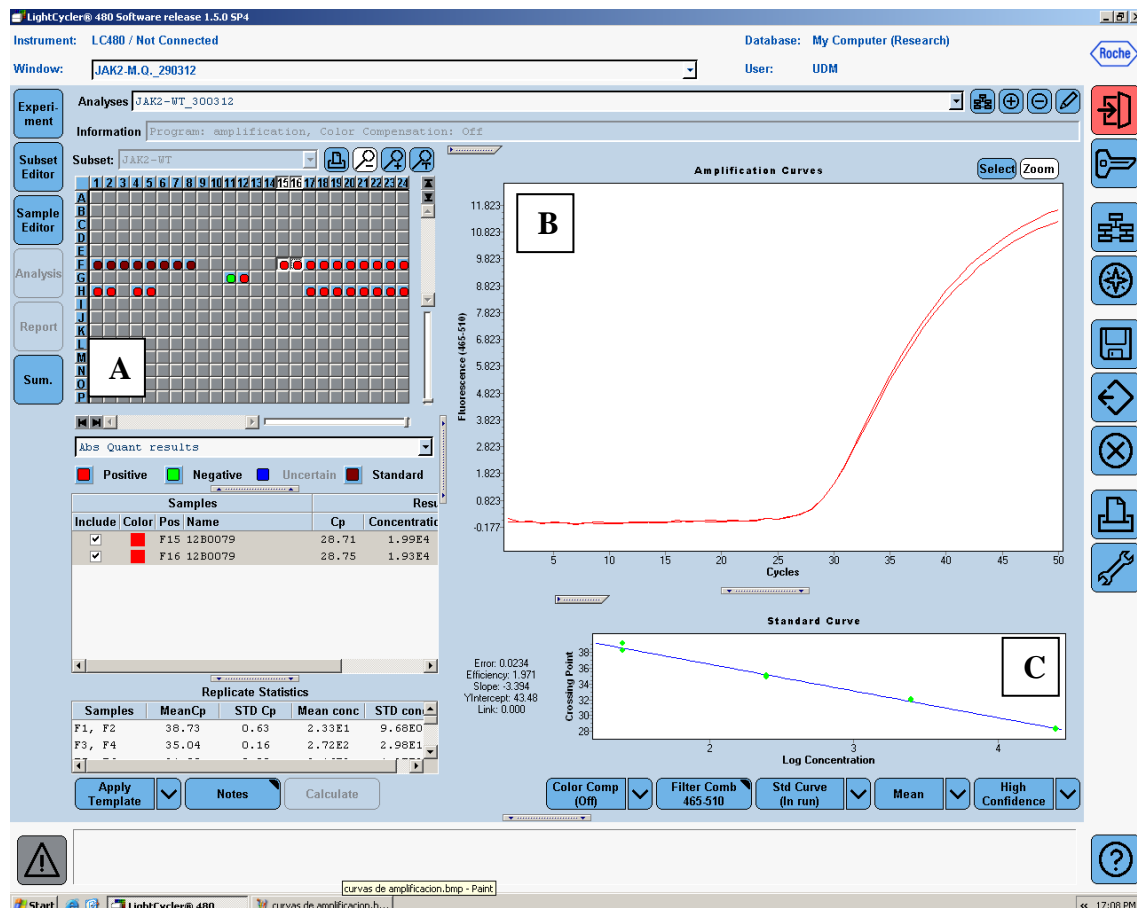


Figura 18: Análisis JAK nativo. a.- Disposición en la placa de 384 pocillos del control positivo para la mutación V617F (H1, H2), del control negativo (H4, H5), de los controles de contaminación (G11, G12) de los patrones de dilución (F1 a F8) y de las muestras de ADN a estudio (desde columna 15 en adelante); b.-Curva de amplificación con una muestra en la que JAK2 está mutado; c.-Recta patrón para el JAK V617F.

Este protocolo utiliza DNA genómico extraído de prácticamente cualquier célula humana a una concentración de 10ng/μl. Los volúmenes de los distintos componentes de la mezcla reaccional fueron los siguientes:

TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X	7,5 μL
Mezcla cebadores/sonda 25X (V617F o WT)	0,6 μL
Agua	4,4 μL
Volumen total por reacción	12,5μL

A este volumen se añaden 2.5 μL de cada muestra (25ng de DNA genómico), se sella la placa con un film de plástico de calidad óptica y se centrifugar brevemente antes de colocar la placa en un *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche Applied

Science). Se ajusta el instrumento en modo de adquisición de sonda fluorescente FAM (465 nm -510 nm) y se ejecuta el siguiente programa de amplificación:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	2 min.	1
95°C	10 min.	1
95°C	15 seg.	50
63°C	1.5 min.	50

Cuando la amplificación terminó se calculan los valores promedios de Cp (*Crossing point*) de las reacciones duplicadas. Se trazan las dos rectas patrones para las reacciones con las sondas WT y V617F respectivamente en base a los datos obtenidos experimentalmente para la serie diluida de muestras estándar con concentraciones conocidas ( $y = \text{Media Cp}$ ;  $x = \text{Log10 CN}$  donde CN= Numero de copias de la muestra estándar /2.5 µl) (Figuras 17C y 18C). Se inserta entonces entre los puntos una recta de tendencia para extraer la ecuación específica de cada curva. Finalmente se usan las ecuaciones de tipo  $y=ax+b$  (dónde a es la pendiente de la recta y b la intersección de esta recta con el eje vertical de la gráfica) de cada recta patrón para calcular el log10 del número de copias (Log10 CN) de los alelos mutado V617F o WT en las muestras desconocidas (Figuras 19 y 20):

$$\text{Log10 CN}_{\text{V617F}} = (\text{Media Cp}_{\text{V617F}} - \text{Intersección curva patrón}_{\text{V617F}}) / \text{Pendiente c.p.}_{\text{V617F}}$$

$$\text{Log10 CN}_{\text{WT}} = (\text{Media Cp}_{\text{WT}} - \text{Intersección curva patrón}_{\text{WT}}) / \text{Pendiente c.p.}_{\text{WT}}$$

c.p.: curva patrón

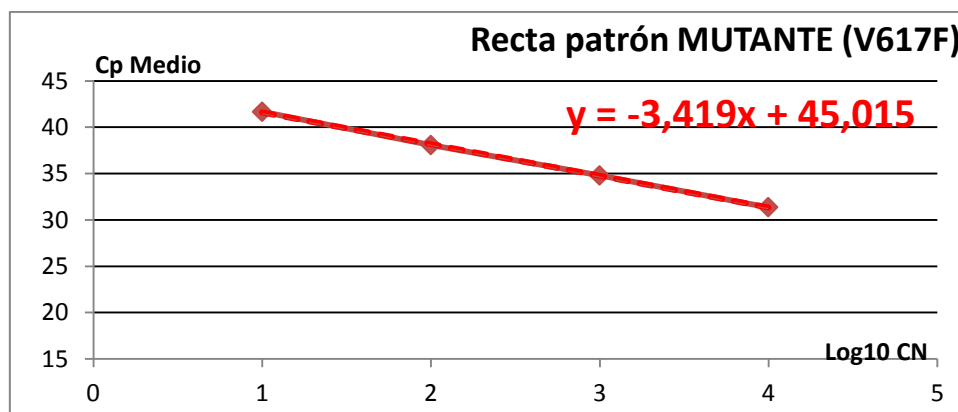


Figura 19. Recta patrón para la reacción con la sonda mutada.

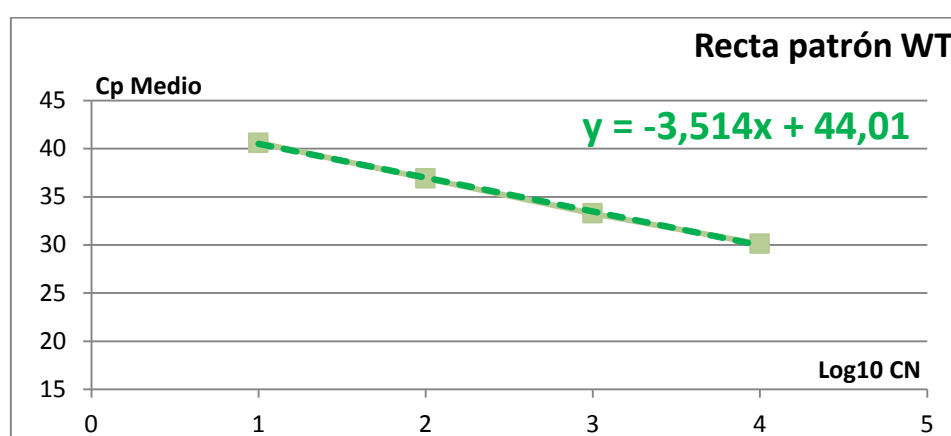


Figura 20. Recta patrón para la reacción con la sonda nativa (wt).

Los resultados obtenidos se corresponden a 25 ng de ADN genómico total y deberán expresarse como porcentajes de *JAK2* V617F:

$$JAK2 \text{ V617F } \% = [CN_{V617F} / (CN_{V617F} + CN_{WT})] * 100$$

Los controles de calidad utilizados han sido los siguientes:

- El control de H<sub>2</sub>O debía dar un valor nulo tanto para *JAK2* V617F como para *JAK2* nativo (WT). Un valor positivo del control de H<sub>2</sub>O reflejaba una contaminación cruzada.
- El control positivo, PC-V617F, debía dar un porcentaje de *JAK2* V617F superior al 99,9%.

- El control negativo, NC-V617F, debía dar un porcentaje de *JAK2* V617F inferior al 0,1%.
- La sensibilidad óptima se obtenía en muestras que contuviesen al menos 10.000 copias de *JAK2* (WT + V617F). De no ser el caso, se repetía el experimento.

El 75% de los pacientes con valor de carga alélica  $>0,01\%$  e inferior o igual al 1%, eran pacientes diagnosticados de TE sin esplenomegalia al diagnóstico. La evolución clínica de los pacientes demostró la no relevancia clínica de un valor de carga alélica  $>0,01\%$  e inferior o igual al 1%. Los pacientes con carga alélica de valor menor o igual al 1% se consideraron *JAK2* negativo, y aquellos con cargas alélicas de valor  $> 1\%$  como *JAK2* positiva. Del mismo modo, si el valor de la carga alélica era inferior o igual a 50%, los pacientes eran clasificados como heterocigotos y homocigotos cuando era superior a 50%. El 71% de los pacientes con carga alélica de valor mayor o igual al 40%, el diagnóstico era de PV y el valor mediano del tamaño del bazo (cm) en el límite alto de la normalidad (12,5:11-15). Dentro del grupo de pacientes heterocigotos se consideraron como alta carga alélica valores superiores o iguales al 40% y baja carga alélica los inferiores a 40%.

### 3. Análisis estadísticos.

Los datos se han analizado mediante el programa estadístico SPSS 9. La descripción de los datos cualitativos se realizó en forma de frecuencias absolutas y porcentajes, y los datos cuantitativos mediante media, mediana, rango y desviación típica según la distribución de los datos. La asociación de las variables cualitativas se analizó mediante el test Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, y las diferencias en la distribución de variables cuantitativas entre dos grupos se estudió mediante el test t-Student para muestras independientes y el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Para estudiar la

asociación entre variables cuantitativas se calculó el coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de correlación de Spearman según la distribución de los datos. Se ajustaron modelos de regresión multivariante de tipo logístico y lineal. Todas las pruebas estadísticas se han considerado bilaterales y como valores significativos, aquellos con valor p inferior a 0.05.

# RESULTADOS



## RESULTADOS

La mutación V617F en el gen JAK2 se detectó en 130 de los 204 pacientes (64%) (Tabla 17). El estudio cuantitativo (Tabla 17) se realizó en los 130 pacientes JAK2<sup>mut</sup> y en 74 pacientes JAK2<sup>wt</sup>. Las características analíticas al diagnóstico y evolución clínica de los pacientes diagnosticados de NMPC de acuerdo con el estado mutacional del JAK2 se especifican en la tabla 17.

Tabla 17: Características analíticas al diagnóstico y evolución clínica de los pacientes diagnosticados de NMPC de acuerdo con el estado mutacional del JAK2.

	TOTAL	JAKV617F mutado	JAKV617F no mutado
<b>CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS</b>			
Pacientes, N° (%)	204	130	74
Varones, N° (%)	86 (42,2%)	51 (39,2%)	35 (47,3%)
Edad (años)*	63,0 (28 - 89)	66 (29-88)	55 (28-89)
Duración de enfermedad (meses)*	44,3 (1,2-305,3)	43,2 (1,2-305,1)	45,5 (2,5-305,3)
<b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS AL DIAGNÓSTICO</b>			
Hemoglobina (g/L)*	14,4 (7,3-21,9)	15,5 (9,1- 21,9)	13,5 (7,3 - 18,0)
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)*	8,6 (1,0-33,0)	9,0 (1,0-33,0)	8,2 (2,7-20,2)
% CD34+ SP *	0,3 (0,0-13,0)	0,1 (0,0-4,0)	0,5 (0,0-13,0)
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)*	558,5 (15,0-1333,0)	533,0 (128,0-1333,0)	580,0 (15,0-1319,0)
LDH (U/L)*	265,0 (12,0-2333,0)	265,0 (19,0-1008,0)	266,0 (12,0-2333,0)
<b>EVOLUCIÓN CLÍNICA</b>			
Tamaño bazo, cm*	12,0 (7,8-22,0)	12,0 (7,8-20,0)	12,0 (8,5-22,0)
N° trombosis posterior al diagnóstico	15	13	2
MFS, n° pacientes	19	12	7
LAM, n° pacientes	6	0	6
N° muertes (LAM 2ª)	4	0	4
N° muertes (IFI)	4	0	4

\*: Mediana (rango).

## RESULTADOS

Noventa y nueve (42 PV y 57 TE) de los 130 pacientes JAK2<sup>mut</sup> (76%) eran de alto riesgo y 32 de los 74 pacientes (43 %) JAK2<sup>wt</sup>. Encontramos un predominio significativo ( $p<0.05$ ) de pacientes de alto riesgo entre los pacientes JAK2<sup>mut</sup> vs pacientes JAK2<sup>wt</sup>. Diecinueve pacientes recibían tratamiento antiagregante y 112 tratamiento citorreductor simultáneo al tratamiento con aspirina.

Las características analíticas y evolución clínica de los pacientes diagnosticados de NMPC de acuerdo con carga mutacional del JAK2 se especifican en las tablas 18 y 19.

Tabla 18: Características analíticas de los pacientes diagnosticados de NMPC de acuerdo con carga mutacional del JAK2.

			PV (52 pacientes)			TE (142 pacientes)			MFP (10 pacientes)	
		TOTAL	PV wt	PV Het.	PV Hom.	TE wt	TE Het.	TE Hom.	MFP JAK+	MFP JAK-
<b>CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS</b>										
Pacientes	N	204	4	28	20	63	74	5	3	7
	%		7,7%	53,8%	38,5%	44,4%	52,1%	3,5%	30,0%	70,0%
Varones	N	86	2	15	9	28	21	4	2	5
	%	42,2%	50,0%	53,6%	45,0%	44,4%	28,4%	80,0%	66,7%	71,4%
Duración de la enfermedad (meses)*	Mediana	44,3	68,8	31,3	138,3	45,5	36,0	18,4	8,0	65,0
<b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS AL DIAGNÓSTICO</b>										
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)*	Mediana	8,6	9,5	9,4	11,8	8,1	8,4	7,2	6,9	10,6
	Rango	1,0-33,0	3,7-12,3	4,7-16,6	3,8-33,0	2,9-19,8	1,0-15,5	6,1-16,0	6,3-9,5	2,7-20,2
Hemoglobina (g/L)*	Mediana	14,4	15,9	16,4	16,3	13,6	14,9	14,8	10,0	11,0
	Rango	7,3-21,9	13,0-16,7	12,0-21,9	11,3-21,3	7,3-18,0	9,6-18,0	12,8-20,5	9,1-14,7	8,3-13,8
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)*	Mediana	558	306	548,5	358	644,0	591,0	465	305	361
	Rango	15-1333	202-316	211-877	182-725	33-1319	276-1333	279-530	128-542	15-633
LDH (U/L)*	Mediana	265	265	249	300	259,5	238	298,5	400	648
	Rango	12-2333	12-2333	520-1510	236-1008	12-1120	19-663	236-763	330-952	398-2333

NMPC: Neoplasia Mieloproliferativa Crónica; PV: Policitemia vera, TE: Trombocitemia esencial, MFP: Mielofibrosis primaria, wt: *wild type*.

Tabla 19: Evolución clínica de los pacientes diagnosticados de NMPC de acuerdo con la carga mutacional del JAK2

	TOTAL 204 pacientes	PV (52 pacientes)			TE (142 pacientes)			MFP (10 pacientes)	
		PV wt	PV Het.	PV Hom.	TE wt	TE Het.	TE Hom.	MFP JAK+	MFP JAK-
EVOLUCIÓN CLÍNICA									
Prurito (nº pacientes, %)	12 5.9%	1 1.9%	0 0.0%	4 7.7%	2 1.4%	4 2.8%	0 0.0%	0 0.0%	1 10.0%
Síntomas sistémicos (nº pacientes, %)	38 18.6%	1 1.9%	4 7.7%	7 13.5%	11 7.7%	10 7.0%	0 0.0%	3 30.0%	2 20.0%
Esplenomegalia > 12.5cm, nº pacientes (%)	40 19.6%	0 0.0%	10 19.2%	9 17.3%	7 4.9%	4 2.8%	3 2.1%	3 30.0%	4* 40.0%
Episodio trombótico arterial (nº)	22	0	2	2	1	13	3	1	0
Episodio trombótico venoso (nº)	17	0	3	1	3	10	0	0	0
Episodio trombótico arterial- venoso (nº)	6	0	3	1	1	0	1	0	0
Progresión a MF2 (nº pacientes/% carga alélica **)	19	1 / 0,0%	2 / 28,69%	6 / 77,3%	6 / 0,02%	1 / 16.41%	3 / 73,3%	0	0
Progresión a LAM 2ª ( nº pacientes)	6	0	0	0	2	0	0	0	4

\* 1 paciente 12,5 cm de bazo; \*\* mediana de carga alélica en el momento de la transformación a mielofibrosis  
PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFP, Mielofibrosis primaria; wt, wild type; MFS, Mielofibrosis secundaria; LAM 2ª, Leucemia aguda mieloblástica secundaria.

## 1.- Carga alélica de JAK2 (V617F) y fenotipo clínico

### 1.1.-Análisis univariante.

Con este análisis univariante se estudió la asociación tanto de la presencia de la mutación como de la carga alélica de JAK2V617F, con la forma de presentación clínica.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

1.1.1-Edad: Se ha encontrado una asociación directa entre edad y el estado homocigoto de la mutación de JAK2 (mayor edad con JAK2 mutado), tanto en la serie completa (p=0.01) (Tabla 17) como por subtipos diagnósticos (PV y TE) con p<0.05 (Tabla 20).

Tabla 20: Asociación de la mutación V617F en el gen *JAK2* con las características analíticas y la hematopoyesis al diagnóstico.

Diagnóstico (n)	JAK2V617F	Características analíticas y hematopoyesis al diagnóstico.	Valor p
NMPC Ph(-) (204)	Homocigoto	Edad	0,01
PV(52)	Homocigoto	Edad	<0,05
TE (142)	Homocigoto	Edad	<0,05
PV (39)	Carga alélica > 40%	[Hb]>15 g/L	0.036
TE (142)	Carga alélica > 50%	[Hb]>15 g/L	0.007
PV JAK2 <sup>mut</sup> (homocigoto o heterocigoto) (48), TE JAK2 <sup>mut</sup> (79) y MFP JAK <sup>wt</sup> (7)	Carga alélica > 50%	Leucocitos >15.10 <sup>9</sup> /L	0.001
NMPC Ph(-) (204)	Carga alélica	Contaje plaquetario bajo	<0,05
PV (52)	Carga alélica > 40%	Hematopoyesis	0.002
TE (142)	Carga alélica > 40%	Hematopoyesis	NS
MFS (19)	Carga alélica > 40%	Hematopoyesis	NS

NMPC: Neoplasia Mieloproliferativa Crónica; PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFP, Mielofibrosis primaria; wt, wild type; MFS, Mielofibrosis secundaria.

1.1.2.-Sexo: De los 204 pacientes, 86 eran varones (42,2%) (Tablas 17 y 18). No se encontraron diferencias ( $p>0.05$ ) en el porcentaje de la mutación entre varones y mujeres.

1.1.3.-Hemoglobina (Hb): En los pacientes diagnosticados de PV, se encontró asociación ( $p=0.036$ ) entre la carga alélica >40% y la concentración de hemoglobina >15 g/L. En los pacientes diagnosticados de TE, se encontró asociación ( $p=0.007$ ) entre estado JAK2<sup>mut</sup> homocigoto y concentración de hemoglobina >15 g/L (Tabla 20).

1.1.4.-Contaje leucocitario: 55 de 204 (27 %) pacientes tenían leucocitosis ( $>11.10^9/L$ ). Esta fue moderada o grave en 15 ( $>15.10^9/L$ ) (Tabla 17 y 18). Los pacientes con leucocitosis pertenecían al grupo de PV JAK2<sup>mut</sup> (homocigoto o heterocigoto), TE JAK2<sup>mut</sup> y MF JAK<sup>wt</sup> (Tabla 18). En este grupo de pacientes encontramos asociación

significativa entre leucocitosis con la carga alélica de JAK2 (V617F) >50% ( $p=0.001$ ) (Tabla 18). La leucocitosis moderada ( $>15.10^9/L$ ) se asocia con la progresión a MF ( $p=0.005$ ) pero no a la transformación a LAM secundaria, ni con las complicaciones trombóticas ( $p>0.05$ ), ya sean arteriales o venosas.

1.1.5.-Contaje de plaquetas: en la serie completa de nuestro estudio encontramos una asociación inversa entre la carga alélica de JAK2 (V617F) y el conteo plaquetario ( $p<0.05$ ) (Tabla 18).

1.1.6.-Celularidad de la medula ósea ajustada a la edad: Hemos encontrado asociación significativa entre mayor grado de hematopoyesis y carga alélica > 40% en pacientes diagnosticados de PV ( $p=0.002$ ). Esta asociación no se comprobó en los pacientes diagnosticados de TE ( $p>0.05$ ) y mielofibrosis secundaria ( $p=0.406$ ) (Tabla 18).

1.1.7.-Prurito: En nuestra serie encontramos asociación significativa ( $p=0.016$ ) entre pacientes homocigotos para la mutación V617F y la presencia de prurito (Tabla 19).

1.1.8.-Tamaño del bazo: Se identificó esplenomegalia al diagnóstico y por ecografía en 43 de 204 casos (Tabla 17): 19 PV, 14 TE y 10 MFP.

Demostramos en pacientes diagnosticados de PV la asociación ( $p=0.001$ ) entre la esplenomegalia ecográfica con la carga alélica JAK2 (V617F). No encontramos asociación entre la presencia de la mutación o el valor de la carga alélica con la detección de esplenomegalia en pacientes diagnosticados de TE ( $p>0.05$ ) y mielofibrosis secundaria ( $p=0,062$ ) (Tabla 21). Demostramos en la serie completa la asociación entre la respuesta clínica con el estado mutacional heterocigoto ( $p=0.02$ ).

Tabla 21: Asociación de la mutación V617F en el gen *JAK2* con la esplenomegalia al diagnóstico.

Diagnóstico (n)	JAK2 V617F	Esplenomegalia al diagnóstico.	p valor
PV (52)	Carga alélica	Esplenomegalia	0,001
TE (142)	Carga alélica JAK2(+)		>0,05
MFS (19)	Carga alélica JAK2(+)		0,062
NMPC Ph(-) (204)	Carga alélica Puntuación de alto riesgo		0,05
NMPC Ph(-) (204)	Homocigoto Puntuación de alto riesgo		0,05
PV (52)	JAK2(+)		0,05
PV (52) y MFS (19)	Homocigoto		0,05 (PV) 0,002 (MFS)

NMPC: Neoplasia Mieloproliferativa Crónica; PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFS, Mielofibrosis secundaria.

## 1.2.-Análisis multivariante.

Realizamos un primer análisis multivariante en la serie completa incluyendo la carga alélica, esplenomegalia y “score” de alto riesgo. Confirmamos la asociación significativa entre la carga alélica y esplenomegalia ( $p < 0.05$ ) y de alto riesgo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 19). Confirmamos en un segundo multivariante, la asociación significativa entre estado homocigoto y esplenomegalia ( $p < 0.05$ ) y estado homocigoto y puntuación de alto riesgo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 21).

En un análisis de regresión en pacientes diagnosticados de PV y mielofibrosis secundaria, donde incluimos estado  $JAK2^{mut}$ , estado  $JAK2^{mut}$  homocigoto, y esplenomegalia confirmamos la asociación entre la esplenomegalia y  $JAK2^{mut}$  ( $p < 0.05$ ) en pacientes diagnosticados de PV, y entre esplenomegalia y estado homocigoto tanto en PV ( $p < 0.05$ ) como en MFS ( $p = 0.002$ ) (Tabla 21).

## **2.-Carga alélica de JAK 2 (V617F) y complicaciones vasculares.**

El perfil de mayor probabilidad de complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas se encontró en 131 de 204 pacientes (64 %). En la serie de 204 pacientes se diagnosticaron 45 episodios trombóticos (Tablas 17 y 19). Treinta pacientes desarrollaron complicaciones trombóticas previas al diagnóstico y el resto durante el seguimiento. Del total de episodios trombóticos: 22 de 45 eran arteriales (15 mayores y 7 menores) que se complicaron con trombosis venosa en 6 pacientes; 17 de 45 eran sólo venosos. Dentro de las trombosis mayores (32) se diagnosticaron 9 accidentes cerebrovasculares (ACV) isquémico-trombóticos, 7 infartos agudos de miocardio (IAM), 12 tromboembolismos venoso-pulmonar (TVP) y 4 trombosis del eje espleno-portal (Budd-Chiari). Las menores fueron trece: 1 angina de pecho, 7 accidentes isquémicos transitorios (AIT) y 5 tromboflebitis superficiales. El 20% (9/45) de las complicaciones trombóticas aparecieron en pacientes homocigotos, 69% (31/45) en heterocigotos y el 11% (5/45) en los pacientes JAK2<sup>wt</sup> (Tabla 19).

### **2.1.-Análisis univariante.**

Hemos comprobado en nuestro grupo que JAK2<sup>mut</sup> ( $p=0.01$ ), carga mutacional de JAK2 ( $p<0.05$ ) y el estado mutacional homocigoto ( $p=0.010$ ) se asocia con probabilidad de desarrollar trombosis en pacientes diagnosticados de trombosis con posterioridad a la cuantificación de JAK2 (Tabla 22). Este resultado se ha confirmado como significativo en TE ( $p<0.05$ ) (Tabla 22).

Tabla 22. Asociación de la mutación V617F en el gen *JAK2* con la evolución clínica al diagnóstico.

Diagnóstico (n)	JAK2 V617F	Evolución clínica	p valor
NMPC Ph(-) (114)	JAK2(+) Carga alélica Homocigoto	Trombosis	0,01 <0.05 0.010
TE (142)	JAK2(+) Carga alélica Homocigoto	Trombosis	0.05
NMPC Ph(-) (114)	Carga alélica Tratamiento Citorreductor	Trombosis	0.006
TE (142)	Carga alélica Tratamiento Citorreductor	Trombosis	0.01
NMPC Ph(-) (204)	Homocigoto Carga alélica	MFS	<0.05 0.02
NMPC Ph(-) (204)	Homocigoto	Fibrosis en MO	0.03
NMPC Ph(-) (204)	Carga alélica	LAM % Blastos en SP	NS NS

TE, Trombocitemia esencial; MFS, Mielofibrosis secundaria; LAM 2ª, Leucemia aguda mieloblástica secundaria, SP, sangre periférica, MO, médula ósea; NS, No significativo.

## 2.2.-Análisis multivariante.

Hemos estratificado a los pacientes según hayan recibido medicación citorreductora o no, de modo que en el análisis multivariante, incluyendo la carga alélica, la aparición de trombosis y el tratamiento citorreductor hemos encontrado que la carga alélica se asocia con la probabilidad de trombosis ( $p=0.006$ ) (Tabla 22). Esta asociación se ha demostrado en los pacientes diagnosticados de TE ( $p=0.01$ ) pero no en pacientes diagnosticados de PV ( $p>0.05$ ) (Tabla 22).

## 3.-Carga alélica y transformación de la enfermedad.

Durante el periodo de estudio, la transformación de la enfermedad a mielofibrosis o leucemia aguda ocurrió en 25 de 204 pacientes (12 %). En 19 pacientes de 25 (76%) la transformación fue a MF secundaria y en 6 de 25 (24%) a leucemia mieloide aguda.



### **3.1.- Transformación a mielofibrosis.**

De los 19 pacientes que progresaron a mielofibrosis, 9 eran JAK2<sup>mut</sup> homocigotos, 6 pacientes diagnosticados de PV (Mediana de carga alélica = 77,3 %) y 3 de TE (73,3 %). Los 10 restantes se distribuían en 2 PV JAK2<sup>mut</sup> heterocigotos (Mediana de carga alélica = 28,69 %), 1 TE JAK2<sup>mut</sup> heterocigoto (16,41%) y 7 JAK2.<sup>wt</sup> La mediana de carga alélica en el momento de la transformación se especifica en la tabla 19. También analizamos la mayor probabilidad de progresión a mielofibrosis post-PV y post-TE y su asociación con la presencia de mutación y la carga alélica. En nuestro estudio la carga alélica (p=0.02) y el estado mutacional homocigoto (p<0.05) se asocia con mayor probabilidad de mielofibrosis secundaria y con el grado de fibrosis en la médula (p=0.03) (Tabla 22). De los 10 pacientes diagnosticados de mielofibrosis secundaria (MFS) post-TE (Tabla 19), 3 habían recibido tratamiento previo con anagrelida.

### **3.2.-Transformación a leucemia aguda mieloide.**

Los 6 pacientes (2 TE y 4 MFP) que progresaron a leucemia aguda eran JAK2<sup>wt</sup> (Tabla 17 y 19). Además no se encontró asociación entre carga alélica JAK2 (V617F) y la mayor probabilidad de progresión a leucemia aguda (p=0.1) ni con el % de células clásticas en sangre periférica (p=0.2) (Tabla 22). Ninguno de los 6 pacientes habían sido tratados con agentes alquilantes tipo busulfán.

## **4.-Carga alélica y supervivencia.**

De los 204 pacientes estudiados, 4 (1%) fallecieron. Las causas de muerte fueron infección fúngica invasiva en 4 pacientes diagnosticados de mielofibrosis transformada a leucemia aguda. La evolución clínica por subgrupos diagnósticos se presenta en la Tabla 19.

## 5.-Seguimiento de la carga alélica.

El estudio cuantitativo a los 6 o 12 meses de la primera determinación de la carga alélica se realizó en 99/130 pacientes JAK2<sup>mut</sup>: 38 Policitemias Vera, 58 Trombocitemias Esencial 3 Mielofibrosis primarias. La mediana de seguimiento fue de 45 meses (3 – 307). En los 99 pacientes con seguimiento de la carga alélica, se ha analizado el número de pacientes sin respuesta hematológica, clínica y/o histológica de acuerdo con los criterios de la *European LeukemiaNet* [254], *IWG-MRT* [252] y *EUMNET* [255] para los pacientes diagnosticados de PV/TE y MF, respectivamente. De 38 pacientes diagnosticados de PV JAK2<sup>mut</sup>, 11, 21 y 10 no se encontraban en respuesta hematológica, clínica o histológica en el último control, respectivamente. De 58 pacientes diagnosticados de TE JAK2<sup>mut</sup>, 9, 12 y 19 no se encontraban en respuesta hematológica, clínica o histológica en el último control, respectivamente. De 3 pacientes diagnosticados de MFP JAK2<sup>mut</sup>, 2 no se encontraban en respuesta completa (1 en progresión y 1 en respuesta moderada) (Tabla 23).

Tabla 23. Número de pacientes con seguimiento semestral/anual de carga alélica sin respuesta hematológica, clínica y/o histológica.

	<b>PV JAK2<sup>mut</sup> (48 pacientes)</b>	<b>TE JAK2<sup>mut</sup> (79 pacientes)</b>	<b>MFP JAK2<sup>mut</sup> (3 pacientes)</b>
<b>Seguimiento semestral/anual de carga alélica V617F</b>	38	58	3
<b>Ausencia de RTA.HEMATÓLOGICA</b>	11	9	1
<b>Ausencia de RTA.CLINICA</b>	21	12	2
<b>Ausencia de RTA.HISTOLÓGICA</b>	10	19	NA

PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFP, Mielofibrosis primaria; JAK<sup>mut</sup>, JAK2 mutado; NA, no aplicable; RTA, respuesta.

En un segundo análisis, se ha analizado el grado de respuesta molecular (completa, parcial o ausencia de respuesta) en los pacientes sin respuesta hematológica, clínica o histológica en los pacientes diagnosticados de PV (38), TE (58) y MFP (3). Se obtuvieron los siguientes resultados.

## **5.1.-Policitemia Vera.**

1.-Once pacientes diagnosticados de PV no se encuentran en respuesta hematológica en el último control: 10 en ausencia de respuesta molecular y 1 en respuesta molecular parcial. Ninguno en respuesta molecular completa (Tabla 24).

2.-Veinte y un pacientes diagnosticados de PV no se encuentran en respuesta clínica en el último control: 19 en ausencia de respuesta molecular y 2 en respuesta molecular parcial. De los 19 pacientes en ausencia de respuesta clínica y molecular, 6 desarrollan MFS (Tabla 25). Los 2 pacientes con respuesta molecular parcial desarrollaron MFS. Ninguno en respuesta molecular completa. Sólo un paciente diagnosticado de PV JAK(-) desarrolla mielofibrosis.

3.- Diez pacientes diagnosticados de PV no se encuentran en respuesta histológica en el último control: 8 en ausencia de respuesta molecular y 2 en respuesta molecular parcial. Ninguno en respuesta molecular completa (Tabla 26).

## **5.2.-Trombocitemia Esencial.**

1.-Nueve pacientes diagnosticados de TE no se encuentran en respuesta hematológica en el último control. Todos en ausencia de respuesta molecular (Tabla 24).

2.- Doce pacientes diagnosticados de TE no se encuentran en respuesta clínica en el último control: 11 en ausencia de respuesta molecular y 1 en respuesta molecular parcial. Ninguno en respuesta molecular completa (Tabla 25).

3.- Diez y nueve pacientes diagnosticados de TE no se encuentran en respuesta histológica en el último control: 17 en ausencia de respuesta molecular y 2 en respuesta molecular parcial (Tabla 26). Ninguno en respuesta molecular completa.

## 5.3.-Mielofibrosis Primaria.

Los pacientes diagnosticados de MFP que no se encuentran en respuesta completa en el último control son 2: 1 en progresión o ausencia de respuesta y otro en respuesta moderada. Los valores de la carga alélica en el momento de la evaluación han sido 21,11% (respuesta molecular parcial) y 59,97%, respectivamente (Tabla 25). El paciente que se encontraba en respuesta completa en el último control, tenía ausencia de respuesta molecular. El valor de la carga alélica en el momento de la evaluación era 51,78%.

Tabla 24. Distribución de los pacientes sin respuesta hematológica en función del diagnóstico y la respuesta molecular semestral/anual.

	<b>PV JAK2 (+) (11)</b>	<b>TE JAK2 (+) (9)</b>
<b>Nº casos NR *</b>	10 (29,96;12,9-90,15)	9 (10,63;8,49-29,68)
<b>Nº casos RMP **</b>	1 (20,18)	0
<b>Nº casos RMC</b>	0	0

PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; NR, ausencia de respuesta molecular; RMP, respuesta molecular parcial; RMC, respuesta molecular completa. \* Mediana (rango) de carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta hematológica \*\* Valor de carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta hematológica

Tabla 25. Distribución de los pacientes sin respuesta clínica en función del diagnóstico y la respuesta molecular semestral/anual.

	<b>PV JAK (+) (21)</b>	<b>TE JAK (+) (12)</b>	<b>MFP JAK (+) (2)</b>
<b>Nº casos NR *</b>	19 (57,72:20,97-96,28)	11 (21,2:8,49-91,09)	2 (21,11 y 51,78)**
<b>Nº casos RMP **</b>	2 (20,28 y 4,81)	1 (3,84)	0
<b>Nº casos RMC</b>	0	0	0

PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFP, mielofibrosis primaria; NR, ausencia de respuesta molecular; RMP, respuesta molecular parcial; RMC, respuesta molecular completa. \* Mediana (rango) de carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta clínica; \*\* Valor de carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta clínica.

Tabla 26: Distribución de los pacientes sin respuesta histológica documentada en función del diagnóstico y la respuesta molecular semestral/anual.

	<b>PV JAK (+) (10)</b>	<b>TE JAK (+) (19)</b>
<b>Nº casos NR *</b>	8 (55,64%:12,9 y 63,8)	17 (24,29: 14,18-91,09)
<b>Nº casos RMP **</b>	2 (4,81 y 1,95)	2 (2,58 y 1,14)
<b>Nº casos RMC</b>	0	0

PV, Policitemia vera; TE, Trombocitemia esencial; MFP, mielofibrosis primaria; NR, ausencia de respuesta molecular; RMP, respuesta molecular parcial; RMC, respuesta molecular completa; NA, no aplicable. \* Mediana (rango) de carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta clínica; \*\* Carga alélica en el momento de la evaluación de la respuesta clínica.

# DISCUSSION

Todas las entidades incluidas dentro de la categoría de NMPC comparten una patogénesis molecular común que conduce a un exceso de producción de células sanguíneas maduras. De ellas, la LMC es fácilmente reconocible por la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph+) positivo. Sin embargo en las NMPC Ph (-), a pesar a la descripción de la mutación V617F en el gen JAK2, el mecanismo íntimo subyacente sigue siendo controvertido e interesante para su estudio.

En líneas generales, es conocido que la presencia de esta mutación confiere una ventaja proliferativa y mayor supervivencia al sensibilizar las células a las señales estimuladoras, causando la expansión clonal de células hematopoyéticas progenitoras [135]. Los primeros informes en 2004 demostraron la importancia crucial de la vía JAK-STAT en la hematopoyesis [257].

En 2005, varios grupos [133-136, 257] y con diferentes enfoques, descubrieron una mutación somática recurrente en el gen JAK2 en una proporción significativa de pacientes con NMPC. La mutación se corresponde a una sustitución de guanina por timina en el nucleótido 1849 del gen JAK2 que resulta en una sustitución valina por fenilalanina en el codón 617 de la proteína JAK2 [257]. La incidencia de la mutación V617F en los granulocitos de pacientes con NMPC, fue un 35-50% en MFP, 32-57% en TE y más del 95% en PV [133, 136]. En prácticamente todos los pacientes con NMPC se han identificado colonias eritroides JAK2V617F homocigotas, lo que sugiere que se llevan a cabo procesos de recombinación mitótica y la duplicación del alelo con la mutación V617F. Por el contrario, en los pacientes diagnosticados de TE la mayoría de colonias cultivadas son de tipo salvaje o heterocigotas [257]. Por otro lado, aún no se sabe por qué la mutación sólo se describe en el codón 617 del gen *JAK2* [257].

Aunque parece claro que la mutación V617F se trata de una mutación somática en las células hematopoyéticas, no podemos excluir la posibilidad de mutaciones en la línea germinal en algunos casos de trastornos mieloproliferativos familiares [258]. Datos previos sugieren dos posibles mecanismos etiopatogénicos de la mutación JAK2 V617F [259]. En uno la mutación heterocigota V617F en el gen *JAK2* por sí sola, o en combinación con una o más mutaciones somáticas preexistentes causa los trastornos mieloproliferativos en aproximadamente 50 % de los pacientes. En otro modelo, la mutación V617F se produce después de la aparición del fenotipo mieloproliferativo. En este modelo, los pacientes con mieloproliferativos sin detección de la mutación en *JAK2* se encuentran en una etapa temprana de la enfermedad mientras que la duración de la enfermedad será mayor en los pacientes con la mutación V617F homocigota. En ambos modelos, la transición de la heterocigosidad en homocigosis representa la evolución clonal. De acuerdo con lo anterior, los datos clínicos revelan correlaciones significativas entre la presencia de la mutación V617F y la frecuencia de complicaciones (fibrosis secundaria, hemorragia y trombosis). Estas correlaciones podrían ser una consecuencia de la mayor duración de la enfermedad en pacientes con las mutaciones en el gen *JAK2* o podrían estar relacionados con una apariencia más agresiva del fenotipo, tal vez debido a una mayor capacidad de respuesta a las citocinas.

Recientemente, una serie de nuevas mutaciones somáticas de ganancia de función en el exón 12 de *JAK2* se han descrito en pacientes con PV JAK2V617F negativo [143, 145, 146, 257]. Inicialmente, se describieron cuatro mutaciones [143]. Tres de ellas consistían en pequeñas delecciones o inserciones en los codones 538 a 543, mientras que la cuarta era la sustitución de una lisina por leucina en el codón 539. Es de destacar que mutaciones en el exón 12 de *JAK2* y la mutación V617F son mutuamente excluyentes. Las mutaciones del exón 12 se localizan en el dominio JH2 de *JAK2*, por lo tanto, es



probable que causen los cambios estructurales que dan lugar a la activación de JAK2. En otro estudio, la más frecuente de todas las mutaciones en el exón 12 fue la delección E543delN542, que se encontró en 17 de los 52 casos reportados [145]. Es importante destacar que mutaciones en el exón 12 están asociadas con eritrocitosis aislada y estimulan la producción de eritropoyetina en suero. Por lo tanto, una mutación en el gen *JAK2* (exones 12 o 14) pueden ser identificada en prácticamente todos los pacientes con PV. El hecho de que los familiares de las personas con NMP están en mayor riesgo para el desarrollo de NMP indica que el factor genético tienen un papel en la patogénesis de estos tumores. El análisis de todo genoma ha demostrado que los portadores de un haplotipo de línea germinal (denominada 46/1) que abarca la región 3' del gen *JAK2* se asocia con un riesgo de desarrollar una NMP JAK2V617F-positivo tres a cuatro veces mayor en comparación con los controles sanos [16, 169]. Además, la mutación V617F es preferentemente adquirida *en cis* en presencia de alelo 46/1[16]. Esto sugiere que el haplotipo 46/1 puede predisponer a la hipermutabilidad en el locus del gen *JAK2*, a pesar de que este haplotipo también fue débilmente asociado con NMPC JAK2V617F negativa.

### **1.-Resumen de los estudios publicados sobre la mutación V617F en el gen JAK2 y NMPC**

Las NMP BCR-ABL negativas clásicas (PV, TE y MF) son verdaderas enfermedades clonales con compromiso de línea mieloide y linfoide. [260]. Sin embargo, el evento oncogénico principal es aún desconocido. Al diagnóstico se encuentran alteraciones citogenéticas en aproximadamente el 50% de los pacientes con MF, 10% al 20% con PV, y menos del 5% con TE [181]. Se han descrito del (13q), del (20q), trisomías 8 y 9, y anormalidades en el cromosoma 1 . Además, tanto la hibridación fluorescente *in situ*

(FISH) como la hibridación genómica comparada han demostrado que las anormalidades más frecuentes están en el cromosoma 9p, ya sea ganancia de material genético como pérdida de heterocigosidad (LOH) [181]. Dado que el cromosoma 9p24 contiene el gen *JAK2* y que está demostrado que la vía JAK/STAT está implicada en la patogénesis de enfermedades mieloproliferativas *BCR-ABL* negativos, se han realizado varios estudios independientes con objeto de investigar el papel de la mutación en *JAK2* en la PV, TE, MF, NMPC atípica y síndromes mielodisplásicos (SMD) (Tabla 27) [181].

Tabla 27: Resumen de los estudios publicados acerca de la frecuencia mutacional *JAK2V617F* en las NMP crónicas.

Referencia	Frecuencias de mutaciones <i>JAK2V617F</i> (homocigotas) en los trastornos mieloproliferativos.*			
	PV	TE	MF con metaplasia mieloide	Otros trastornos mieloides
Baxter <i>et al.</i> <sup>[133]</sup>	97% (26%) N=73	57% (0%) N=51	50% (19%) N=16	NA
James <i>et al.</i> <sup>[134]</sup>	89% (30%) N=45	43% (NA) N=21	43% (NA) N=7	NA
Kralovics <i>et al.</i> <sup>[135]</sup>	65% (27%) N=128	23% (3%) N=93	57% (22%) N=23	LMC 0% (n=9)
Levine <i>et al.</i> <sup>[136]</sup>	74% (25%) N=164	32% (3%) N=115	35% (9%) N=46	NA
Zhao <i>et al.</i> <sup>[261]</sup>	83% (NA) N=24	NA	NA	NA
Steensma <i>et al.</i> <sup>[202]</sup>	NA	NA	NA	SMD 5% (n=101); LMMC 3% (n=119); SHE 0% (n=11); SM 25% (n=8); LNC 17% (n=6).
Jones <i>et al.</i> <sup>[262]</sup>	81% (33%) N=72	41% (7%) N=59	43% (29%) N=35	LMC 0% (n=18); LMMC /DMPnc 20% (n=152); SHE /LEC 2% (n=134); MS 0% (n=28); LNC 33% (n=6); LMA 0% (n=17).

\* Las frecuencias mutacionales en los diferentes estudios no son comparables debido a la utilización de ensayos con sensibilidad variable. PV, policitemia vera; TE, trombocitemia esencial; MF; mielofibrosis; LMA, leucemia mieloide aguda; LEC, leucemia eosinofílica crónica; LMC, leucemia mieloide crónica; LMMC, Leucemia mielomonocítica crónica, LNC, leucemia neutrofílica crónica; SHE, síndrome hipereosinofílico; SMD, síndrome mielodisplásico; NA; no aplicable; MS = mastocitosis sistémica; DMPnc , desorden mieloproliferativo no clasificado. (traducido de Tefferi y Gilliland, 2005).

La naturaleza somática de la mutación fue confirmada por análisis de frotis bucal que muestra un alelo nativo en 301 (96%) de 313 pacientes. La mutación no se detectó en los 270 sujetos del grupo control, lo que confirma que el alelo no es un polimorfismo en la población general[153]. Las técnicas FISH y PCR indicaron que la homocigosis para el alelo mutante es el resultado de la recombinación mitótica en lugar de pérdida de heterocigosis (LOH). Estudios clínicos correlativos revelaron una asociación significativa entre la presencia de un alelo mutante y el sexo femenino en PV (83% vs 64%) y mayor duración de la enfermedad en pacientes homocigotos ya sea con PV o ET. Un informe de investigadores de la Universidad de Cambridge en el Reino Unido, que examinaron la mutación V617F por secuenciación reveló la presencia del alelo mutante en los granulocitos de 53 (73%) de 73 pacientes con PV (26% homocigotos), 6 (12%) de 51 con TE (ninguno homocigoto) y 7 (44%) de 16 con MF (19% homocigotos) [133]. Posteriormente, los autores utilizaron tecnología más sensible, la PCR alelo específica, que puede detectar una mutación heterocigota en 3% de células mutadas, y demostraron la presencia de la mutación en 71 (97%) de 73 pacientes con PV, 29 (57%) de 51 con ET, y 8 (50%) de 16 de MF, pero no en las muestras control. Además demostraron, que en los pacientes diagnosticados de PV, la incidencia de homocigosis no estaba influenciada por el momento del diagnóstico. Posteriormente investigadores en Francia demostraron resultados similares [134]. Los investigadores en Suiza e Italia analizaron 244 pacientes con neoplasias mieloproliferativas, incluyendo 128 con PV, 93 con ET, y 23 con MF.[135] En este grupo observaron la pérdida de heterocigosis (LOH) en la región 9p en el 34% de los pacientes con PV, 22% con MF y el 3% con TE. Posteriormente otros estudios han analizado la incidencia de JAK2V617F tanto en NMPC/SMD como SMD [263].

## 2.-Las consecuencias funcionales de mutaciones en *JAK2* en NMPC.

El dominio JH2 de JAK2 tiene una homología significativa con dominios tirosina quinasa (dominio JH1), pero carece de actividad catalítica. La evidencia actual sugiere que JH2 está involucrado en la auto-inhibición de la actividad JAK2 [134]. La expresión de JAK2V617F en FDCP (factor dependiente de células progenitoras) determina que las colonias eritroides pueden ser cultivadas en ausencia de EPO exógena a partir de la sangre periférica de pacientes [134, 136, 143]. Sin embargo, las colonias eritroides de pacientes con mutaciones en exón 12 son típicamente heterocigotos para la mutación, en contraste con los portadores de la mutación V617F en que, con frecuencia, la mutación se encuentra en estado homocigótico. El papel potencial de mutaciones en exón 12 en la patogénesis de la NMP se ha demostrado en modelos experimentales en los que se encontraron que la mutación K539L en el exón 12 para causar eritrocitosis en vivo [257]. Curiosamente, en contraste con la mutación V617F, las mutaciones en el exón 12 parecen limitarse a PV, lo que podría estar asociado con la activación de diferentes vías de señalización y quizás a un fenotipo clínico [143].

Cuando la mutación V617F se expresa en células hematopoyéticas, varias vías de señalización que son importantes para la proliferación y la supervivencia son activadas, incluyendo STAT3, STAT5, la vía MAPK-ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellular signal-Regulated Kinase*) y la vía de señalización PI3K-AKT (*PhosphoInositide 3-Kinase, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) [257, 264]. Tras la fosforilación de JAK2, monómeros STAT, se dímerizan y se trasladan al núcleo, donde modulan la transcripción de genes implicados en la proliferación celular y la supervivencia, como BCL-X (*B cell linfoma-X*), que es conocido porque se expresa en

los precursores eritroides de pacientes con PV [257]. La mutación V617F se ha detectado en células madre CD34 + CD38-hematopoyéticas, así como en todos los linajes de células sanguíneas maduras en pacientes con NMP .

Las pruebas experimentales en modelos de ratón y en muestras de pacientes sugieren que la mutación V617F causa eritrocitosis y progresión a mielofibrosis [134]. Además, la carga alélica JAK2V617F se correlaciona con la cifra de leucocitos y los niveles de hemoglobina en pacientes con PV [165]. De hecho, la proporción de alelos mutados sobre alelo de tipo salvaje parece modular las manifestaciones fenotípicas de las NMP [259]. Las mutaciones de exón 12 de la JAK2 también dan lugar a un fenotipo mieloproliferativo con eritrocitosis y crecimiento de colonias eritroides. Por lo tanto, las proteínas mutantes JAK2 representan un blanco atractivo para el tratamiento de NMPC[257].

### **3.-La carga alélica JAK2V617F**

La clasificación actual de la OMS incluye la presencia de la mutación V617F como un criterio mayor para el diagnóstico de estas entidades. No obstante, existen varias técnicas para determinarla, y en la práctica clínica el médico que trata a estos pacientes puede recibir el resultado del estudio de la mutación V617F en forma de positivo/negativo, negativo/heterocigoto/homocigoto o bien en forma de porcentaje por PCR cuantitativa, es decir, el valor de la carga alélica. La carga alélica de la mutación V617F del gen *JAK2* (JAK2V617F) se define como la ratio del número de copias del alelo *JAK2* mutado ( $JAK2^{mut}$ ) sobre el número de copias totales del gen *JAK2* (alelo salvaje,  $JAK2^{wt}$  + alelo  $JAK2^{mut}$ ).

Es importante destacar que en estas enfermedades coexiste hematopoyesis clonal JAK2V617F mutada con hematopoyesis normal no mutada lo cual hace que la carga

mutacional al diagnóstico sea variable de unos pacientes a otros. Desde el punto de vista diagnóstico la determinación de JAK2V617F como positivo o negativo sería suficiente según los criterios de la OMS por lo que la realización de Q-PCR no sería necesaria. Sin embargo varios estudios han relacionado una elevada carga alélica al diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad con la aparición de sintomatología, esplenomegalia, trombosis y mielofibrosis. Por este motivo la realización de PCR cuantitativa al diagnóstico para conocer la carga mutacional de los pacientes podría ser útil. La cuantificación molecular de la mutación V617F en el gen *JAK2* varía considerablemente dentro de las NMPC. Esta variabilidad contribuye, al menos en parte, a la determinación de las manifestaciones del fenotipo, así como del curso clínico.

### **3.1.-Asociación carga alélica JAK2V617F con el fenotipo clínico y el diagnóstico de TE y PV.**

Existen datos que apoyan un fenotipo clínico común para TE JAK2V617F positiva y PV[163], sin embargo en un estudio identificaron un modelo biológico subyacente que diferenciaba entre estas dos entidades [265]. Estos autores encontraron que no había pacientes diagnosticados de TE en los que se detectaran colonias de células, por el contrario estas colonias se detectaron en todos los pacientes diagnosticados de PV ( $p=0,0001$ ) y en dos pacientes con TE después de la transformación a PV. Esto sugiere que una diferencia fundamental entre TE JAK2V617F positiva y PV puede estar en los eventos de recombinación mitótica que generan las células hijas homocigotos para la mutación V617F. Se ha demostrado que la carga alélica de JAK2 mutado es consistentemente más alta en los pacientes con PV, MFP o MF post-PV que en aquellos con TE [259, 266]. El efecto biológico de la carga alélica puede ser el grado de activación *STAT5*, donde la activación de las células humanas CD34+ favorece la

diferenciación eritroide, y la reducción de la megacariopoyesis [267]. Por otro lado las mutaciones del exón 12 del *JAK2* se asocia con una mayor activación de la ruta de señalización *JAK-STAT* en comparación con la mutación V617F, y se encuentran en los pacientes con PV, pero no en aquellos con TE [259].

La detección de la mutación V617F en NMPC se ha asociado con mayor edad al momento del diagnóstico (ET y MFP) [266], mayor nivel de hemoglobina (PV, TE y MFP) [228], leucocitosis (PV, TE y MFP) [268] y el menor número de plaquetas (ET) [178]. Las correlaciones clínicas con la carga alélica *JAK2V617F* también están surgiendo. Los datos presentados por Vannucchi [269, 270] muestran que el hematocrito, número de leucocitos [270, 271], niveles de lactato deshidrogenasa, y fosfatasa alcalina fueron directamente relacionadas con la carga alélica *JAK2V617F*, mientras que el valor de VCM (volumen corpuscular medio) y plaquetas estaban inversamente relacionados. La carga alélica *JAK2V617F* aumenta con el tiempo en PV y MFP [272] pero no en TE [228]. Este fenómeno en PV y MFP coincide con el desarrollo de la mielofibrosis post-PV, marcada esplenomegalia (PV, y MFP) [221, 227, 270, 271] y el requerimiento de quimioterapia [225, 269, 270].

### **3.2.-Impacto de la mutación V617F en el diagnóstico de PV**

En la era pre-*JAK2V617F*, el diagnóstico clásico de PV se basó en criterios de consenso que incluían variables medibles (por ejemplo, la masa eritroide, hematocrito, recuento de plaquetas y la concentración sérica de eritropoyetina) o hallazgos sugestivos (por ejemplo, la histología de médula ósea). Los criterios diagnósticos reconocidos a nivel internacional fueron descritos por el Grupo de Estudio de la policitemia vera (PVSG) y la organización Mundial de la Salud (OMS) [273]. Sin embargo otros autores han

eficazmente argumentado que la arbitrariedad de los niveles umbral, ya sea en el recuento de plaquetas o la masa eritroide, compromete la detección de las fases iniciales de la enfermedad[274]. Por otro lado las observaciones recientes de la Clínica Mayo y la Universidad de Harvard han planteado la posibilidad de que todos los pacientes diagnosticados de PV podrían ser positivos para la mutación V617F [225, 275, 276]. Esta afirmación está apoyada por algunos estudios [133, 165] pero no por otros [135]. En un intento de conciliar las discrepancias en la frecuencia de mutaciones entre los diferentes estudios, los casos que se había informado anteriormente como PV JAK2V617F negativo fueron reexaminados en la clínica Mayo [277]. Se demostró que el diagnóstico de PV es inexacto en 4 pacientes, cuestionable en 1 y la mutación fue detectada por técnicas más sensibles en 5 pacientes [278]. Entre los 7 pacientes restantes, 4 estaban recibiendo o habían recibido tratamiento con interferón alfa que dio lugar a la remisión hematológica completa que podría haber afectado a la detección de la mutación [279]. La detección de la mutación se realizó en el momento de la transformación leucémica en dos pacientes con antecedentes no bien documentados de diagnóstico de PV. Del mismo modo, la frecuencia de detección de las mutaciones aumento de acuerdo con la experiencia de la Universidad de Harvard cuando técnicas más sensibles se utilizaron. Por lo tanto, es probable que la imprecisión diagnóstica y la sensibilidad inadecuada de la técnicas son las principales causas de los casos notificados de PV JAK2V617F(-). Causas adicionales de resultados falsos negativos incluyen la utilización subóptima de tejido para la detección de mutaciones y el efecto del tratamiento en la carga alélica [279, 280]. Estos datos apoyan la recomendación de análisis de sangre periférica para la mutación V617F en la evaluación inicial de un paciente con sospecha de PV [158]. Sin embargo no se puede excluir la posibilidad de casos de PV JAK2V617F negativos en el momento del estudio, y por lo tanto, es



conveniente obtener medición concomitante de los niveles séricos de eritropoyetina para minimizar las posibilidades de los resultados tanto falsos negativos como falsos positivos. En consecuencia, si la sospecha clínica de la PV es baja, un análisis negativo de JAK2V617F en sangre periférica acompañado de niveles de EPO en suero normales o elevados, va en contra del diagnóstico específico y debe aplazar nuevas pruebas diagnósticas como biopsia de médula ósea o la medición de masa eritroide. Sin embargo, la prueba adicional de médula ósea se indica en la alta sospecha clínica de la PV o en la discrepancia entre los dos resultados de las pruebas [158]. En nuestro estudio hemos analizado una cohorte de 204 pacientes diagnosticados de NMPC que disponían de estudio mutacional del gen *JAK2*. En concordancia con lo publicado [135, 281] en nuestra serie el 92,3% de los pacientes diagnosticados de PV son JAK2<sup>mut</sup>. Sin embargo había un pequeño subgrupo de pacientes (4 de 52 pacientes, 7,7%) (Tabla 18) que eran negativos para la mutación. En este grupo de pacientes es posible que otras mutaciones en el exón 12 pudieran ser responsables en el desarrollo del fenotipo de PV [282]. Este estudio está actualmente en investigación pero es probable que el curso clínico de los pacientes con mutaciones en el exón 12 sea similar a aquellos con JAK2 mutado [283]. En los 4 pacientes de nuestra serie diagnosticados de PV JAK2 negativos, la detección de mutaciones en exón 12 fue negativa. Este estudio se realizó por secuenciación y en el curso evolutivo de la enfermedad con tratamiento, por lo que no hemos podido precisar la relevancia de estos resultados. En nuestro grupo y en concordancia con otras publicaciones [203] hemos demostrado que los pacientes, diagnosticados de PV y carga alélica JAK2 > 40%, tenían significativamente ( $p=0.036$ ) valores de Hb > 15 g/L. De acuerdo con criterios diagnósticos actuales hay que resaltar que estos dos datos (JAK2<sup>mut</sup> y nivel alto de Hb) son fundamentales para el diagnóstico de PV.

### 3.3.-Impacto de mutación JAK2V617F en el diagnóstico de TE y MF

A diferencia de PV, la utilidad de la detección de mutaciones para JAK2V617F para el diagnóstico de ET y MF está limitada por el valor predictivo negativo subóptimo y la falta de especificidad diagnóstica. No obstante, la detección de la mutación V617F es razonable para la evaluación inicial de trombocitosis no filiadas (Figura 21) [181].

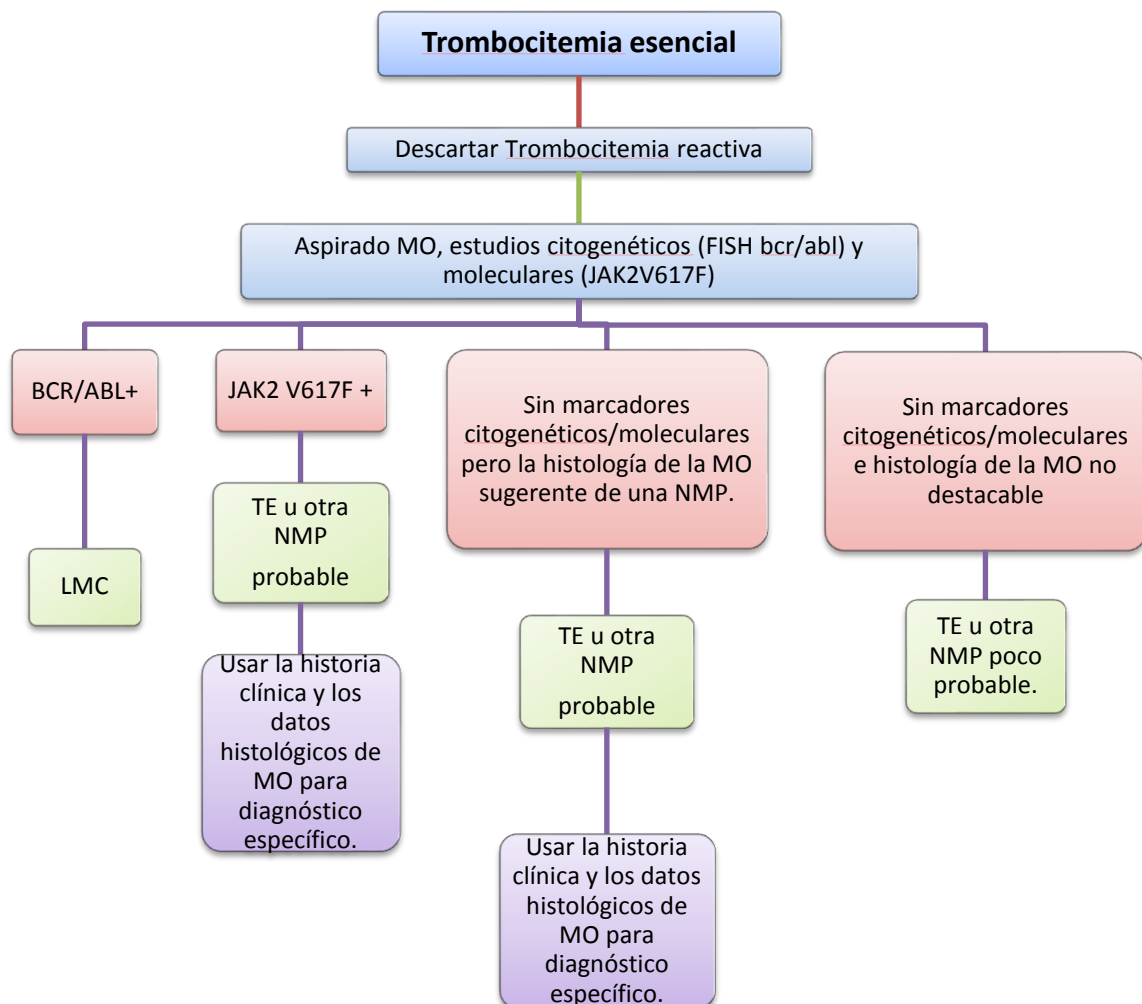


Figura 21. Algoritmo diagnóstico de la trombocitemia esencial (TE) que incorpora la detección de la mutación V617F. Además de la historia clínica, pruebas de laboratorio que son útiles para distinguir trombocitosis reactiva de TE incluyen la ferritina sérica, frotis de sangre periférica, y la proteína C-reactiva. MO, médula ósea; LMC, leucemia mieloide crónica; FISH, hibridación fluorescente *in situ*; JAK2, Janus kinase 2, SMD, síndrome mielodisplásico; MMM, mielofibrosis con metaplasia mieloide; NMP, neoplasia mieloproliferativa, PV, policitemia vera.

En consecuencia, un resultado positivo sugiere una alta probabilidad de NMPC y baja de LMC. Sin embargo, una biopsia de médula ósea es todavía necesaria para diferenciar TE de MF así como otras causas de trombocitosis clonal incluyendo SMD y NMPC atípicos. Por otro lado, la presencia de pacientes JAK2V617F homocigotos favorece el diagnóstico de PV y no TE [165, 265]. Nuestro trabajo, al igual que otro estudio [203] ha objetivado la asociación ( $p < 0.01$ ) entre estado JAK2<sup>mut</sup> heterocigoto y diagnóstico de TE.

Por otro lado, la detección de la mutación V617F en el diagnóstico de las diferentes entidades que componen las NMPC Ph (-) clásicas (PV, TE y MFP), otra indicación aparte y actual está en la detección de NMPC “latente”. En este sentido es necesario la detección de la mutación V617F en pacientes que desarrollan complicaciones trombóticas de localización inusuales (abdominal o cerebral), trombosis arterial a edad temprana y otras manifestaciones clínicas características de NMPC Ph (-) incluida la eritromelalgia y prurito. La necesidad de estudios familiares en estos casos es controvertido [277]. Finalmente, en presencia de la detección de la mutación V617F se debe confirmar el diagnóstico de NMPC por métodos alternativos. Del mismo modo, aunque el uso de pruebas de una adecuada sensibilidad de detección de mutaciones facilita el diagnóstico, no hay que olvidar la posibilidad de falsos positivos como resultado de una prueba tan sensible [265].

### 3.4.-Asociación de JAK2V617F con complicaciones trombóticas-hemorrágicas

En nuestra serie no hemos demostrado que la leucocitosis se asocie con el desarrollo de trombosis ni con la supervivencia global en pacientes de alto riesgo. Estos hallazgos están en concordancia con algunos estudios [268, 284] y en discrepancia con otros [203]. En este sentido, destaca un trabajo que describe pacientes jóvenes diagnosticados de TE y sin historia previa de trombosis, en los que se demuestra un incremento progresivo del número de leucocitos [285]. Este incremento se asociaría a una alta probabilidad de desarrollo de trombosis. Sin embargo otro estudio en 891 pacientes diagnosticados de TE demostró que ni la leucocitosis ni la trombocitosis tiene un efecto significativo sobre la incidencia de trombosis, siendo la edad avanzada el principal factor de riesgo [286]. El bajo tamaño de nuestra muestra y la intensificación del tratamiento en pacientes mayores de 60 años podrían justificar que, a diferencia de lo anteriormente mencionado, en nuestra serie no hemos encontrado asociación significativa entre la edad y la presencia de trombosis. Sin embargo en nuestro estudio sí hemos demostrado la asociación ya publicada [287] entre la edad y el estado homocigoto. En nuestro grupo es la presencia de la mutación V617F y no el estado mutacional homo o heterocigoto de la misma, el parámetro que se asocia al desarrollo de trombosis. Estos datos están de acuerdo con algunos autores[168, 232, 270, 287] y en discrepancia con otros [268]. Hemos de destacar que en un estudio se encontró asociación entre estado homocigoto y desarrollo de trombosis en pacientes diagnosticados de TE [269]. Otro estudio confirmó una relación entre la carga alélica superior y el riesgo de trombosis [270], pero estas asociaciones no se observaron en otro análisis [271]. Hemos de destacar que estos estudios no son comparables dado que se ha utilizado ADN de médula ósea [271] y no ADN [225] o ARNm [270] purificado de

granulocitos. En líneas generales, la evidencia actual no es concluyente en cuanto a la relación entre JAK2V617F y trombosis [288, 289]. La diferencia en la mediana del conteo leucocitario entre pacientes JAK2 positivos y negativos podría justificar una mayor incidencia de trombosis en pacientes diagnosticados de NMPC JAKV617F positivo. En un estudio la mutación V617F en los pacientes con TE se asocia ( $p=0,02$ ) con un mayor riesgo de resultados adversos cardiovasculares debido a aumento en el recuento de leucocitos [168]. Otro estudio confirma que los leucocitos pueden contribuir a la patogénesis de la trombosis en la trombocitemia esencial (TE) a través de mecanismos recientemente descubiertos de la activación y la interacción con las plaquetas y células endoteliales [47]. En este sentido, *Falanga et al.* estudió la relación existente entre los diferentes parámetros de activación leucocitaria y plaquetaria y la presencia de la mutación V617F en JAK2 en 38 pacientes afectados de TE, observando que los pacientes con la mutación presentaban un mayor porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes [290]. Posteriormente, el grupo de Arellano-Rodrigo estudió la activación plaquetaria, la activación leucocitaria y los complejos leucocito-plaqueta en dos cohortes de pacientes con TE, con y sin antecedente de trombosis, y en un grupo control constituido por 29 donantes de sangre [291]. En este último estudio, los pacientes con TE presentaron un aumento en todos los parámetros estudiados de activación, así como en el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes cuando se comparaban con los valores obtenidos en donantes sanos. Pero, además, los pacientes con TE y trombosis presentaron un mayor porcentaje de plaquetas que expresaban P-selectina, tanto en condiciones basales como tras estimulación con ácido araquidónico, así como una mayor expresión de CD11b y factor tisular monocitario que los pacientes con TE sin trombosis. Dichos hallazgos sugieren que en la TE, tanto la activación plaquetaria como la leucocitaria, fundamentalmente la monocitaria, están

involucradas en la génesis de la trombosis. Además, los pacientes con TE y mutación en *JAK2* tenían una mayor expresión de P-selectina plaquetaria basal y tras estimulación con ácido araquidónico, lo cual a su vez, sugiere que la activación plaquetaria en la TE depende de la presencia de la mutación V617F en *JAK2* [291]. Si tenemos en cuenta que la mayoría de pacientes con PV presentan la mutación en *JAK2*, estos hallazgos indicarían que tanto la activación plaquetaria como la leucocitaria podrían desempeñar un papel relevante en la patogenia de la trombosis en los pacientes con PV.

En nuestro estudio al igual que en publicaciones previas [286], los episodios trombóticos, eran mayoritariamente arteriales tanto en pacientes diagnosticados de TE como de PV. No hemos observado hemorragias importantes en nuestra serie. Nuestros datos están en concordancia con los datos publicados [286] que no han encontrado asociación ni entre la trombocitosis grave y la mayor probabilidad de hemorragia ni entre trombocitosis leve-moderada y la mayor probabilidad de trombosis.

### **3.5.-Asociación JAK2V617F con progresión/transformación de NMPC**

En líneas generales entendemos que las NMPC se transforman a enfermedad agresiva con la aparición de enfermedades vasculares graves o síntomas constitucionales, pero especialmente con el desarrollo de mielofibrosis o leucemia aguda [7]. El riesgo de transformación a mielofibrosis es compartida por todas las NMPC Ph- aunque la probabilidad varía en función de la entidad clínica (PV>TE). En líneas generales en pacientes diagnosticados de NMPC Ph (-), se desarrolla MF en un 10% a 20% después de 15 a 20 años de seguimiento [3, 292] La esperanza de vida media en pacientes diagnosticados de MFS se estima en 5-7 años, pero puede aproximarse a 15 años en pacientes jóvenes con factores de buen pronóstico [3]. El trasplante alogénico de células

madre es el único tratamiento curativo para la MFS pero sólo unos pocos pacientes son candidatos a ser tratados con dosis mieloablativas [293] o acondicionamiento de intensidad reducida [294]. Además los prometedores ensayos clínicos sobre los inhibidores de JAK2 están actualmente en curso [72, 295] dado que hasta la fecha no se ha demostrado que ningún fármaco ni siquiera el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH), influya de forma positiva en la supervivencia [72, 293].

### **3.5.1.-Progresión/Transformación en TE**

En un estudio de 806 pacientes con TE, se ha observado que la progresión a PV se ha limitado a los pacientes con mutación V617F en el gen *JAK2* [46]. En un estudio previo [36], se demostró asociación estadística entre nivel elevado de Hb y número de granulocitos, EPO baja y médula ósea hipercelular en pacientes diagnosticados de TE *JAK2* V617F positiva en comparación con los pacientes con TE *JAK2* negativa. Este estudio apoya un modelo continuo entre los pacientes diagnosticados de TE *JAK2* positiva y fenotipo PV [223]. El estado de la mutación V617F, sin embargo, no se correlacionó con la presencia de fibrosis en los pacientes diagnosticados de TE incluidos en el gran estudio prospectivo MRC PT1 [296]. En nuestra serie hemos encontrado asociación entre leucocitosis moderada ( $>15 \cdot 10^9/L$ ), nivel Hb  $>15g/L$  y mayor probabilidad de transformación a mielofibrosis con *JAK2*<sup>mut</sup> homocigoto en pacientes diagnosticados de TE.

### **3.5.2.-Progresión/Transformación en PV**

Es importante destacar que el diagnóstico de mielofibrosis secundaria sólo se aplica a los pacientes con evidencia de características clínicas tales como la anemia, esplenomegalia, síntomas constitucionales, o leucoeritroblastos en sangre periférica.

Los pacientes con los porcentajes más altos de JAKV617F fueron más propensos a tener prurito [270]. Este hallazgo no se demostró en estudios previos [46, 297]. Nuestros datos no han demostrado la asociación descrita [270, 298] entre actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y presencia de la mutación en *JAK2*, pero sí entre la presencia de prurito [299] en pacientes diagnosticados de PV y el estado homocigoto para la mutación V617F. Esto apoya el argumento de que el estado mutacional homocigoto se asocia con una enfermedad más avanzada sintomática o acelerada.

Sin embargo, sigue siendo controvertida la asociación de estado homocigoto con la progresión a mielofibrosis [270, 300]. En los pacientes con PV, aunque el papel de la mutación V617F en la progresión hacia la fibrosis es actualmente desconocido, la transición de estado heterocigoto a homocigoto podría representar un paso importante en la progresión hacia la mielofibrosis post-PV [298]. Los pacientes con MF post-PV tienen una alta carga alélica que va desde 91% a 100% [181]. De hecho, se han descrito series en las que el 78% de pacientes con diagnóstico de MF post-PV tenían más del 50% de alelos mutados [301]. En nuestro grupo, y en concordancia con otros estudios, hemos encontrado asociación entre el estado homocigoto y la leucocitosis [284] y entre la mutación y la esplenomegalia en pacientes diagnosticados de PV y mielofibrosis secundaria. En nuestra serie la leucocitosis es factor pronóstico de desarrollo de MFS y hemos encontrado la asociación descrita por algunos autores entre  $JAK2^{mut}$  homocigoto y mayor probabilidad de transformación a mielofibrosis en pacientes diagnosticados de PV. La mutación V617F puede activar a los granulocitos circulantes, jugando un papel importante en la movilización de células CD34 en sangre periférica [77, 301]. Este fenómeno es particularmente evidente en los pacientes con PV y MF post-PV [301]. Esto sugiere que en pacientes con PV, con datos clínicos (esplenomegalia) y/o analíticos (leucocitosis, trombocitosis...) sugestivos de mieloproliferación, son los candidatos más



idóneos para ensayos clínicos con los inhibidores de JAK2. En comparación con la MF pos-PV, en los pacientes diagnosticados de MFP se describe una tasa de homocigosis de la mutación V617F del 28% [227]. Son necesarios más estudios prospectivos para confirmar si existe asociación entre la carga alélica y el desarrollo de MF pos-PV.

### **3.5.3.-Progresión/Transformación en Mielofibrosis**

#### **3.5.3.1.-Transformación leucémica en las NMPC (Ph-)**

Sigue siendo controvertida la asociación entre estado homocigoto y leucemia secundaria [226]. Los datos más recientes e interesantes se describen con respecto a las rutas para el desarrollo de leucemia aguda en 16 pacientes con JAK2 mutado (7 de 16) o de tipo salvaje (9 de 16) [163]. La LAM JAK2 positiva es precedida por una(s) mutación(es) que da lugar a un “fenotipo de Mielofibrosis” [15]. Las mutaciones en la *JAK2* podrían estar implicadas en la adquisición de alteraciones genéticas adicionales porque JAK2V617F se asocia con aumento de la inestabilidad genética [302, 303]. Son necesarios más estudios acerca de los “*hit*” genéticos que subyacen en caso de enfermedad progresiva y por qué algunos pacientes progresan más rápidamente que otros. La utilidad de este modelo es que no se aplican las restricciones en la definición de las entidades según la Clasificación de la OMS y se ajusta a los datos más recientes en relación a la heterogeneidad clínica y biológica de estas enfermedades. Hay razones para sospechar que hay otras mutaciones somáticas distintas a la mutación V617F que contribuyen a la patogénesis de las NMPC Ph (-). En primer lugar, se han demostrado en pacientes con NMPC, anormalidades citogenéticas como la delección 20q [304] incluso en presencia de la mutación V617F [305]. Además, el análisis molecular de los dos pacientes JAK2V617F positivo y delección 20q, demostró que la delección 20q se encontraba en todas las células hematopoyéticas, mientras que la mutación V617F en un

grupo celular más pequeño [306]. Estos datos, así como el análisis de una gran cohorte de NMPC [276], sugieren que hay "alelos pre-JAK2 " responsables para un aumento en exceso de la hematopoyesis de la clona con la mutación V617F. Además, muchos pacientes diagnosticados de NMPC JAK2V617F (+) se transforman a leucemia aguda JAK2V617F(-) [305, 307], como resultado de la presencia de progenitores hematopoyéticos JAK2V617F(-) transformados (Figura 22; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) [308].

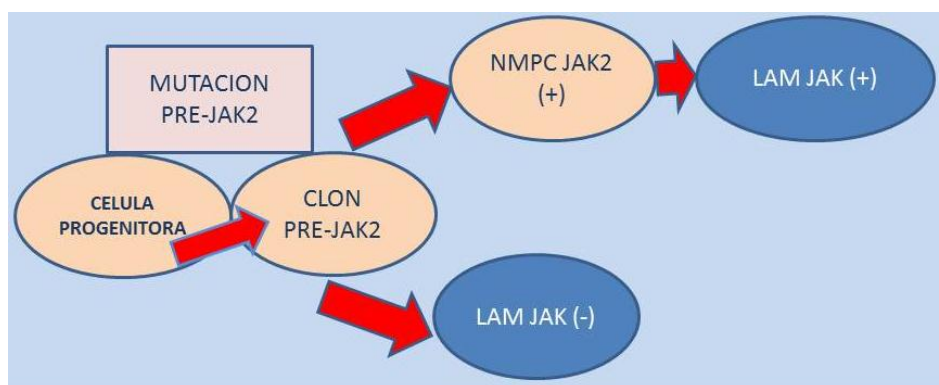


Figura 22. Modelo de transformación leucémica.

Hasta la fecha, ningún grupo ha identificado pacientes diagnosticados de NMPC JAK2V617F(-) que posteriormente adquirieron el alelo V617F durante la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que la clona "pre-JAK2" no se manifiesta como una NMPC. La identidad de estos alelos "pre-JAK2", y su relación con la señalización por JAK2 y la patogénesis de NMP, es el tema de estudio de muchos investigadores. En nuestra serie, es probable que el bajo tamaño de la muestra no nos permita encontrar, en este momento la controvertida asociación [213, 226, 309] entre carga alélica con la mayor probabilidad de transformación a leucemia aguda mieloide en pacientes diagnosticados de MFP. En nuestra serie tampoco la leucocitosis ha sido factor pronóstico de desarrollo de complicaciones a largo plazo como leucemia aguda. Dado

que los 4 pacientes que fallecieron fueron diagnosticados de MFP con JAK2 nativo pese a la ausencia de un adecuado tamaño de la muestra, nuestro estudio sugiere que la alta carga alélica de *JAK2* (V617F) no afecta a la supervivencia en mielofibrosis primaria [213, 310] siendo necesarios más estudios prospectivos para la validación de nuestros resultados.

### **3.5.3.2.-Relacion de la transformación leucémica con el tratamiento.**

Se ha demostrado que los pacientes diagnosticados de NMPC no tratados puede transformarse, pero sólo en muy raras ocasiones, en leucemia aguda [99]. Por el contrario los pacientes que recibieron tratamiento previo con fósforo ( $P^{32}$ ), agentes alquilantes o tratamiento combinado de los fármacos anteriores con hydrea (HU), tienen un mayor riesgo de leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico [305, 311]. No está claro si esto refleja el efecto combinado de las drogas o la selección de pacientes más avanzados que requieren mayor tratamiento y, por tanto, de las formas más evolucionadas de la enfermedad. Sin embargo, la capacidad leucemógena de HU (hydrea) sigue siendo un tema controvertido. En estudios prospectivos aleatorizados en pacientes con TE no se encontró diferencia significativa en la incidencia de leucemia aguda entre los pacientes no tratados y los pacientes tratados con HU o anagrelida solos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios, o bien carecen de seguimiento a largo plazo (necesaria para evaluar la toxicidad tardía de HU) o se llevaron a cabo de acuerdo con los criterios PVSG (Grupo de Estudio de la policitemia vera), haciendo caso omiso de la distinción entre mielofibrosis prefibrótica y verdadera TE. En un gran estudio retrospectivo de 357 pacientes diagnosticados de TE, y tratados con HU, la progresión a LMA/SMD se observó en el 4,5%, a menudo asociados a la delección 17p [93]. En el mismo estudio, 201 pacientes diagnosticados de TE y que habían sido tratados sólo con

HU, la tasa de progresión a LMA/SMD fue del 3,5%. Nielsen y Hasselbalch demostraron que la progresión a LMA/SMD, está alrededor de 3,4% de los pacientes diagnosticados de TE tratados con HU [235]. La información más relevante de la capacidad leucemógena de la HU se espera de los futuros estudios aleatorizados que incluyen pacientes clasificados de acuerdo con los criterios de la OMS 2008. En el momento actual, a falta de un estudio controlado, es difícil definir la capacidad leucemógena de las drogas aparte de la evolución clonal intrínseca de la enfermedad (Figura 23) [95].

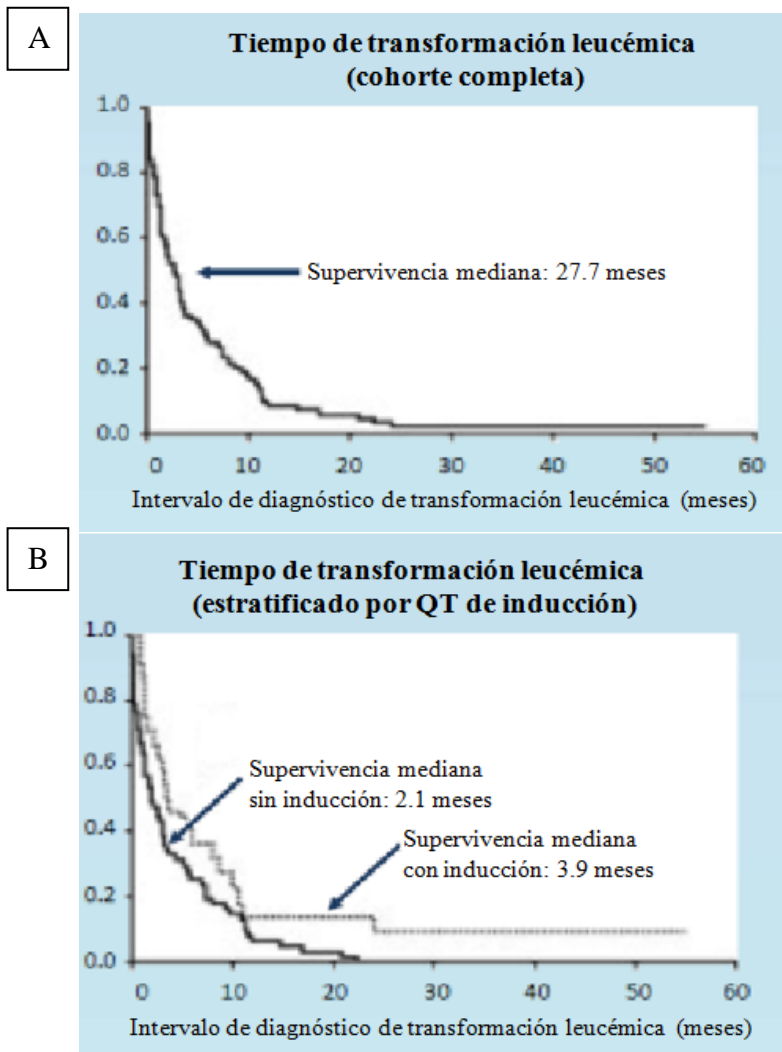


Figura 23. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia de 91 pacientes con mielofibrosis con metaplasia mieloide (modificado de Mesa *et al.*, 2005). Las curvas de supervivencia muestran los datos del (A) el momento de la transformación leucémica (cohorte completa), y

(B) el momento de la transformación leucémica (estratificada por haber recibido la quimioterapia de inducción).

Otra modalidad terapéutica en la MF, que se ha implicado en la aceleración de la ocurrencia de transformación leucémica, es la esplenectomía [312]. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido apoyada por observaciones de otros estudios [81, 312, 313]. Se ha descrito [312] que aproximadamente un tercio de los pacientes con transformación leucémica habían sido esplenectomizados sin ninguna evidencia de asociación temporal con la transformación blástica. La historia natural de la MF, aunque muy variable dependiendo de la presentación clínica, ha sido abordada por grandes series y ningún estudio ha demostrado mejora de la supervivencia independientemente de la modalidad terapéutica [81, 314, 315]. Algunos estudios demuestran que la transformación leucémica en MF por lo general ocurre en el contexto de enfermedad avanzada y se asocia con mal pronóstico, así como una pobre respuesta al tratamiento actualmente disponible [95]. La quimioterapia de inducción se asoció con una alta tasa de mortalidad relacionada con el tratamiento (33%) y no parece ser superior a los cuidados paliativos. El alotrasplante de células madre sólo se utiliza en pacientes jóvenes muy seleccionados. La edad, comorbilidad, la falta de una donante compatible y la necesidad de citorreducción, importante antes del trasplante, limita esta terapia a un número escaso de pacientes. Teniendo en cuenta los malos resultados observados, sólo un pequeño subgrupo de pacientes: (a) son candidatos para la quimioterapia de inducción y (b) logran una citorreducción significativa con la inducción, y siguen siendo candidatos para trasplantes después de las toxicidades asociadas a la inducción.

A pesar de la pobre supervivencia, la consideración de quimioterapia agresiva o la posibilidad de ofrecer trasplante alogénico de células madre para los pacientes seleccionados, no debe descartarse en LAM con lesiones citogenéticas de buen

pronóstico. Se han descrito casos (41%) de transformación a fase crónica en las condiciones antes señaladas [1]. De lo contrario, la participación en protocolos de tratamiento experimental es muy recomendable. En última instancia, la mejor oportunidad para el éxito global podría residir en el desarrollo de eficaces armas terapéuticas en la fase crónica de la enfermedad que prevengan el desarrollo de transformación leucémica, de ahí la importancia de los nuevos fármacos.

### **3.6.- Asociación de JAK2V617F con la supervivencia en NMPC.**

En términos de supervivencia, dos grandes estudios de la Clínica Mayo, uno en TE (n=150; mediana de seguimiento de 132 meses) [223] y el otro en MF (n=117; mediana de seguimiento en torno a 37 meses) [221], no han identificado el estado mutacional JAK2V617F positivo como un factor pronóstico independiente. Por el contrario, otro estudio multicéntrico desarrollado en Europa [222], informó una menor supervivencia, posiblemente vinculado a un mayor riesgo de transformación leucémica, en pacientes diagnosticados de MF con la mutación V617F (n=152; mediana de seguimiento, 38 meses). La relación entre la carga alélica JAK2 V617F y el pronóstico en la MFP, no está del todo claro, ya que los hallazgos que han sido reportados son controvertidos . Mientras que hay estudios que informan que la positividad de JAK2 V617F se asocia con una peor supervivencia global [46, 222, 227]. Los estudios de otros grupos no corroboraron estos hallazgos [212, 213]. En estos últimos estudios, los pacientes MFP fueron divididos en cuatro grupos (V617F-negativos y V617F positivos con cuartiles bajos, medios y altos de la carga de alelo mutante). Curiosamente, entre todos los grupos, los pacientes en el cuartil más bajo tenían una supervivencia significativamente peor en general [212, 213, 221].

### 3.7.-Elección del agente citorreductor y estado mutacional JAK2 V617F

La hidroxiurea es la citorreducción de uso más frecuente en el tratamiento de NMPC. Los pacientes diagnosticados de PV y TE JAK2V617F positivos son más sensibles a la hidroxiurea en comparación con los pacientes JAK2V617F negativos. En un estudio fase 2, el tratamiento con interferón pegilado alfa2b, en pacientes diagnosticados de PV JAK2V617F positivos, ha demostrado reducir la carga alélica de manera significativa y llevar a la remisión molecular en 4 pacientes [316]. En otro estudio [248] se ha demostrado eficacia de interferón pegilado alfa-2a en la reducción de la carga alélica. Se ha realizado un estudio prospectivo de un solo centro y se ha analizado la carga alélica en diversos puntos temporales en los granulocitos purificados de 47 pacientes diagnosticados de NMPC y tratados con hidroxiurea durante un seguimiento de al menos 12 meses. Se ha demostrado una reducción significativa en la carga alélica en los pacientes diagnosticados de PV y ET [317]. En nuevos estudios prospectivos se estudiará si las determinaciones seriadas de la carga alélica JAK2 se puede utilizar para evaluar la respuesta a la terapia citorreductora. Sin embargo, para los pacientes diagnosticados de NMPC antes del descubrimiento de las mutaciones en JAK2, la mutación V617F en el momento del diagnóstico no está disponible. Nuestros datos sugieren que cargas alélicas determinadas más adelante en el transcurso de la enfermedad puede ser igualmente informativas en los pacientes que no han estado en terapia citorreductora antes de la primera determinación cuantitativa de las mutaciones en JAK2. Sin embargo, esto podría no ser aplicable en los pacientes que fueron ya tratados con hydrea. La hydrea induce una disminución inicial de la carga alélica antes de estabilizarse. Por otro parte y de acuerdo con nuestros resultados es probable que exista una asociación significativa entre la ausencia de respuesta hematológica,

progresión de la esplenomegalia y la transformación a mielofibrosis con el aumento de la carga alélica en pacientes diagnosticados de PV y TE. En estos pacientes sería útil la monitorización de la carga alélica. Estos resultados están en concordancia con algunos estudios[317, 318] y en discrepancia con otros [319, 320] de ahí la importancia de estudios prospectivos para validar estas observaciones. Es controvertido la utilidad de la monitorización de la carga alélica en pacientes diagnosticados de MFP y no hay datos disponibles concluyentes sobre los efectos de la anagrelida sobre la carga alélica.

### **3.8.- Inhibidores de JAK: su valor y sus limitaciones**

#### **3.8.1.-Inhibidores JAK2 en PV/TE**

En los pacientes diagnosticados de TE o PV y resistentes o intolerantes a hidroxiurea, los inhibidores de JAK2 han demostrado ser eficaces para controlar la mieloproliferación. Los datos son controvertidos en términos de su capacidad para prevenir la trombosis o disminuir la probabilidad de enfermedad acelerada o agresiva.

En un estudio con INC18424 (ruxolitinib) tanto en pacientes diagnosticados de TE (39) como en pacientes diagnosticados de PV (34), se observaron tasas similares de reducción del tamaño del bazo y mejoría de los síntomas. Todos los pacientes obtuvieron recuentos de leucocitos por debajo de  $10 \times 10^9/L$  y el 41% y lograron una remisión completa con recuento de plaquetas inferior a  $400 \times 10^9/L$ . Hasta el momento no se han reportado eventos trombóticos.

Moliterno y cols. trataron 39 pacientes (12 ET y 27 PV) con inhibidores de JAK2 [321]. Todos los pacientes tenían enfermedad de alto riesgo y muchas líneas de tratamiento previas. Se presentaron marcados efectos secundarios gastrointestinales y, aunque hubo



respuestas en esplenomegalia, prurito, y en los requerimientos de flebotomía (después de 6 meses), el tratamiento no se asoció con una reducción tanto de leucocitosis como de trombosis. Cinco eventos trombóticos ocurrieron durante el tratamiento.

Serán necesarios más estudios para demostrar si la inhibición de *JAK2* podría alterar la historia natural de la enfermedad (es decir, mejorar la supervivencia o la supervivencia libre de progresión) en pacientes diagnosticados de TE o PV.

## 3.8.2.-Inhibidores de JAK2 en la Mielofibrosis

Se están investigando diversos tratamientos en MF post-PV/ET y MFP [20]. Entre los más novedosos destacan pomalidomida, inhibidores de *JAK2*, inhibidores de *mTOR* [322, 323] e inhibidores de histonas como panobinostat (LBH589) y givinostat (ITF2357) [324].

Los inhibidores de la *JAK2* que están actualmente en ensayos clínicos incluyen ruxolotinib (INCB018424), SAR302503 (TG101348), CYT387, lestaurtinib (CEP-701), SB1518, AZD1480, BMS911543, LY2784544 y XL019. Destacaremos por su importancia: INCB018424, TG101348 y CEP701. (Tablas 28 y 29) [257].

Tabla 28. Potencia y selectividad de los inhibidores del JAK2 en las NMPC:

Compuesto	JAK2 IC <sub>50</sub> (nM)	Selectividad contra JAKs (selectividad X-fold)			Fase de desarrollo
		JAK2 vs JAK3	JAK2 vs JAK1	JAK2 vs TYK2	
<b>Ruxolitinib</b>	2.8	153	1.1	6.7	Fase III
<b>TG101348</b>	3	332	35	135	Fase II
<b>Lestaurtinib</b>	1	3	NA	NA	Fase II
<b>XL019</b>	2	125	65	170	Interrumpida

IC50, concentración 50% Inhibidora; JAK, Janus quinasa; TYK2, tirosina proteína quinasa 2 no receptora.

Tabla 29. Actividad inhibitoria de los inhibidores del JAK2

Compuesto	IC <sub>50</sub> (nM)				Fase de desarrollo
	JAK1	JAK2	JAK3	TYK2	
<b>SB1518</b>	1,28	23	520	50	Fase I/II
<b>CYT387</b>	11	18	155	N/A	Fase I/II
<b>AZD1480</b>	1.3	<0.4	3.9	N/A	Fase I/II
<b>INCB028050</b>	5.9	5.7	560	53	Fase II*
<b>INCB16562</b>	2.5	0.3	10.8	2.7	Preclinical
<b>Tasocitini**</b>	1.7	1.8	0.75	260	Fase II/III*
<b>NVP-BSK805</b>	31.6	0.48	18.6	10.7	Preclínica.

\* Probado sólo en las enfermedades reumatológicas, no en NMP. \*\* Valores expresados como Kd (constante de disociación). IC50, Concentración 50% Inhibidora; JAK, Janus quinasa; TYK2, tirosina proteína quinasa 2 no receptora.

Los resultados de estos estudios hasta la fecha indican diferencias sustanciales entre estos fármacos en su toxicidad y perfiles de eficacia, algunos de los cuales podría estar relacionado con sus propiedades farmacocinéticas.

INCB018424 es un inhibidor potente y selectivo de Janus quinasa *JAK1* y *JAK2*. Se ha demostrado una supresión, dosis dependiente, de la fosforilación de la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción 3 (*STAT3*), en pacientes con *JAK2* salvaje y en pacientes con la mutación V617F en el gen *JAK2*. Este fármaco ha sido evaluado en 153 pacientes con MFP o MF post-PV/ET en un estudio fase-1/2[325]. Se ha establecido que una dosis de inicio de 15 mg dos veces al día, seguido de un ajuste individualizado de la dosis, en la dosis más eficaz y segura. A esta dosis, 17 de 33 pacientes (52%) tuvieron una respuesta objetiva rápida ( $\geq 50\%$  de reducción de la esplenomegalia) con una duración de 12 meses o más y efectos adversos asociados a esta terapia de grado 3 o grado 4 (principalmente mielosupresión) en menos del 10% de los pacientes. De los 153 pacientes diagnosticados de MF, la toxicidad limitante de dosis fue la trombocitopenia en 21. Entre los eventos adversos, además de la

trombocitopenia, se incluyeron anemia y un rebote secundario a la liberación de citoquinas tras la interrupción del tratamiento [325]. La alta tasa de abandono (92% después de un tiempo mediano de tratamiento de 9,2 meses) fue debida a la aparición de síntomas de abstinencia graves durante la interrupción del tratamiento. Este "Síndrome de abstinencia a ruxolitinib" se caracteriza por la recaída aguda de los síntomas de la enfermedad: esplenomegalia, empeoramiento de las citopenias y descompensación hemodinámica, incluyendo el shock séptico que, a veces, requieren de una hospitalización. En un trabajo reciente, 5 pacientes experimentaron un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en la interrupción del tratamiento [326]. Para prevenir o disminuir la intensidad de la reacción de recuperación de citoquinas, se recomienda evitar la interrupción brusca del tratamiento [327]. Además, a veces, el uso de tratamiento oral con corticoides (0,5 mg/kg/d), puede ayudar a los pacientes a tolerar la interrupción. La trombocitopenia o anemia grado 3/4 (en pacientes independientes a las transfusiones al inicio del estudio) se objetivaron en el 39% y 43% de los pacientes que recibieron el fármaco en 25 mg dos veces al día, respectivamente [328, 329]. A una dosis más baja de 10 mg dos veces al día, las cifras correspondientes fueron 10% y 16%, pero la tasa de respuesta para la esplenomegalia (30%) también fue inferior a 10 mg dos veces al día en comparación con 25 mg dos veces al día (49%). Los eventos adversos no hematológicos fueron poco frecuentes.

Entre todos los pacientes evaluables, el 44% experimentaron una disminución del 50% en tamaño del bazo palpable. Mejoría de los síntomas constitucionales (fatiga, prurito, malestar abdominal, saciedad precoz, sudores nocturnos) y el aumento de peso se observaron en la mayoría de los pacientes. Cuatro de 28 pacientes (14%) dependientes de transfusiones se convirtieron en independientes a la transfusión. El efecto del fármaco sobre la carga alélica JAK2V617F y la patología de la médula ósea fue

insignificante, pero una reducción importante en citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-6, FNT, etc.) se documentó y coincidió con la mejoría de los síntomas constitucionales. Este efecto fue demostrado independientemente de estado mutacional del *JAK2* o el subtipo de mielofibrosis.

Dos estudios aleatorios que comparaban ruxolotinib, ya sea con placebo o con una mejor atención de apoyo, han sido reportados de una forma abstracta. En el ensayo clínico COMFORT-1 que comparó el fármaco con placebo (N= 309) la tasa de respuesta en el bazo fue de 42% para ruxolotinib vs <1% para el placebo [330]. Además, alrededor del 46% de los pacientes experimentaron importantes mejorías en sus síntomas constitucionales. Sin embargo, el beneficio de la droga fue antagonizado por efectos secundarios asociados como anemia (31% vs 13,9%) y trombocitopenia (34,2% vs 9,3%). En el ensayo COMFORT-2 que, en comparación de la droga con la "mejor" terapia disponible (N= 219), el respuesta del bazo fue del 28,5% con ruxolotinib frente a 0%, pero la droga resultó ser perjudicial en términos de trombocitopenia (44,5% vs 9,6%), anemia (40,4% vs 12,3%) y diarrea (24,0% vs 11,0%).

TG101348 es un inhibidor JAK2/FLT3. En un estudio fase 1/2 de 59 pacientes con MF, en 20 la toxicidad limitante de dosis fue un aumento reversible y asintomática de la amilasa sérica y de la lipasa, y la dosis máxima tolerada fue de 680 mg/d [331]. Los efectos adversos grado 3/4 fueron reversibles y dosis-dependientes. Incluyeron náuseas (3%), vómitos (3%), diarrea (10%), aumento de la lipasa sérica (27%), transaminasas (27%) o creatinina (24%), en 39% y 47% de los pacientes respectivamente, se logró una disminución del 50% en el tamaño del bazo palpable y la mayoría también experimentó mejoras en la saciedad precoz, fatiga, sudores nocturnos, tos o prurito. Casi todos los pacientes con trombocitosis y la mayoría de los pacientes con leucocitosis experimentó normalización de las cifras leuco-plaquetarias. En general, las respuestas no se vieron

afectadas por la presencia o ausencia de la mutación V617F, sin embargo, una disminución del 50% de la carga alélica se observó en el 39% de pacientes con una carga alélica inicial JAK2V617F>20%. El efecto sobre la patología de la médula ósea no ha sido limitado.

CEP-701 es un inhibidor JAK2/FLT3. En un estudio fase 2, 22 pacientes diagnosticados de MF JAK2V617F positivo recibieron el fármaco por vía oral a 80 mg dos veces al día [332]. Un 50% de reducción del bazo se logró en 4 de 18 pacientes evaluables (22%), y 2 de 8 pacientes dependientes de transfusiones (25%) se convirtieron en transfusión independientes. Los efectos secundarios grado 3/4 incluyeron la anemia (14%), trombocitopenia (23%) y diarrea (9%). La droga no ha afectado a la fibrosis medular o la carga alélica. Diecinueve citoquinas plasmáticas diferentes, incluyendo citoquinas proinflamatorias, se midieron al inicio y después del tratamiento y no mostraron diferencias en sus niveles entre respondedores y no respondedores y entre el inicio y después del tratamiento. Los resultados de otros ensayos clínicos de los inhibidores de JAK (AZD1480, B1518 y LY2784544) no se han publicado todavía en su totalidad.

Estudios fase 1/2 utilizaron otros inhibidores *JAK1/JAK2*, *CYT387* en los que una tasa de respuesta del 40% en la anemia se acompañaba de una respuesta igualmente notable en la esplenomegalia y síntomas constitucionales [333]. La droga fue bien tolerada, con eventos adversos poco frecuentes de grado 3/4 que incluyeron trombocitopenia en el 22% de los pacientes y anemia en solo un 3%.

Sobre la base de esta discusión, tres aspectos importantes se destacan acerca de los inhibidores de JAK disponibles en la actualidad y su valor en la MF. En primer lugar, ninguno de ellos fue capaz de inducir remisiones completas. En segundo lugar, son muy diferentes los unos de los otros en términos de actividad terapéutica y perfil de efectos

secundarios. El tercer aspecto está relacionado a su distinto mecanismo de acción. En este sentido la baja regulación de citocinas proinflamatorias puede ser secundaria a menor mieloproliferación (con INCB018424) u origen clonal (con TG101348). Es posible que el balance del efecto combinado de estos parámetros regule el espectro de la actividad de estos fármacos.

Las observaciones anteriores muestran grandes diferencias en la toxicidad y el perfil de la actividad entre los distintos inhibidores JAK y subrayan la necesidad de evaluar las drogas antes de emitir conclusiones con respecto al valor de la terapia anti-JAK2 en MF o NMP relacionados.

Pomalidomida es una droga inmunomoduladora de segunda generación. En un estudio aleatorizado fase 2, 25% de los pacientes con anemia respondió en monoterapia (2 mg/día) o en combinación con prednisona (0,5 o 2 mg/día)[334]. En un posterior estudio en fase 2 de la pomalidomida en monoterapia (0,5 mg / día)[335], la respuesta a la anemia sólo se documentó en presencia de JAK2V617F (24% frente al 0%) o la ausencia de marcada esplenomegalia (38% vs 11%). La respuesta a la trombopenia se observó en el 58% de los pacientes. Como efectos secundarios posibles destaca la neuropatía o la mielosupresión. En un estudio fase 2 no se demostró una mejor actividad en dosis más altas (> 2 mg / día), que por el contrario se asociaron con una mayor mielosupresión [336].

### 3.9.-Otros fármacos

También se hace evidente que algunos de los efectos saludables de estos fármacos podrían ser el resultado de una potente actividad anti-citoquina mTOR. La vía JAK-STAT conduce a la activación de la vía Akt/Mtor por lo que es razonable evaluar la actividad terapéutica de los inhibidores de Akt y mTOR. En un estudio fase 1/2 con el

inhibidor de mTOR, everolimus, incluyendo 39 pacientes con MF, la toxicidad más común fue estomatitis de grado 1-2 [337]. Una reducción > 50% en la esplenomegalia en el 20% de los pacientes evaluados y la respuesta a los síntomas constitucionales afectó a 69% y un 80% experimentó resolución completa del prurito. El efecto de las drogas sobre la leucocitosis o la anemia fue modesto e insignificante en la carga alélica. La tasa de respuesta fue del 23%.

La mielofibrosis en fase blástica, es en gran parte, refractaria a la quimioterapia convencional y la terapia de inducción intensiva no tiene un impacto significativo con una supervivencia media de 3,9 meses. Once pacientes consecutivos fueron tratados en nuestra institución con mielofibrosis en fase blástica en un período de dos años. Se han desarrollado estudios de pacientes no candidatos a trasplante alogénico de células madre (ASCT) y tratados con decitabina (DEC) [338]. El tiempo medio de seguimiento fue de 9 meses (rango 5-21 meses). A los 9 meses (rango 5-45 meses), el 67% de los pacientes tratados con decitabina estaban vivos y a los 20 meses (rango 9-23 meses), el 53% de los pacientes sometidos a TMO alogénico estaban vivos. La reducción de la intensidad de acondicionamiento del alotrasplante de células madre (RIC-ASCT) es una opción viable que ofrece la posibilidad de una supervivencia prolongada y la posibilidad de curación para los pacientes con mielofibrosis en fase blástica. Decitabina es un régimen de quimioterapia ambulatoria tolerable para pacientes MF-BP no aptos para el trasplante y merece mayor estudio prospectivo.

Este estudio tiene las siguientes limitaciones:

- (1) El número de pacientes no permite el análisis estratificado de algunos datos en relación a la evolución clínica y supervivencia de nuestra serie.
- (2) Es controvertida la utilidad de la monitorización de la carga alélica y su valor predictivo de respuesta hematológica y clínica en pacientes diagnosticados de PV y TE. Sin embargo dada la relevancia clínica de estos aspectos y pese a un adecuado tamaño de la muestra, nuestra serie confirma la necesidad de un estudio prospectivo y multicéntrico. Este estudio está actualmente en curso.
- (3) Dada la mediana de seguimiento de la serie, no se ha podido obtener en todos los casos la cuantificación de CD34+ al diagnóstico y su asociación con la carga alélica de JAK2. Sin embargo se ha analizado la asociación del grado de hematopoyesis y la carga alélica de JAK2.



# CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo de investigación pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. La detección de la mutación V617F, la alta carga alélica de JAK2V617F y el estado mutacional homocigoto se asocia con mayor edad al momento del diagnóstico, mayor nivel de hemoglobina, mayor hematopoyesis, leucocitosis y el menor número de plaquetas.
2. El estado mutacional homocigoto complementa a los criterios diagnósticos actuales (JAK2<sup>mut</sup> y nivel alto de Hb) que son fundamentales para el diagnóstico de PV. En casos de eritrocitosis JAK2V617F negativos, no se puede excluir el diagnóstico de PV, siendo necesario la detección de mutaciones en exón 12 del gen *JAK2*.
3. A diferencia de PV, la utilidad de la detección de la mutación V617F en el gen *JAK2* para el diagnóstico de ET y MF está limitada y la biopsia de médula ósea para el diagnóstico diferencial es necesaria.
4. Existe una asociación entre la mutación V617F y el desarrollo de trombosis, pero no con hemorragias en pacientes diagnosticados de NMPC Ph(-).
5. En el momento actual, la carga alélica JAK2V617F no es un criterio estándar de estratificación de riesgo. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, es probable que el estado JAK2<sup>mut</sup> homocigoto (carga alélica >50%) permita clasificar a los pacientes en un grupo de alto riesgo.

6. Para los pacientes diagnosticados de NMPC Ph (-) con un valor de carga alélica >50% sería recomendable el inicio de un tratamiento citorreductor o con otros agentes en fases avanzadas de desarrollo, como son los inhibidores de JAK.
7. La transición del estado mutacional heterocigoto a homocigoto representa un paso importante en la progresión hacia la mielofibrosis post-PV y post-TE.
8. No existe asociación entre la mutación V617F en pacientes diagnosticados de mielofibrosis y el desarrollo de leucemia secundaria.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Tefferi A., *How I treat myelofibrosis*. Blood, 2011. **117**(13): p. 3494-504.
2. Rozman C., J.L. Corrons, L.H. Nieto, E. Feliu and A. Ester, *Idiopathic myelofibrosis: a possible role of immunological phenomena*. Br J Haematol, 1982. **50**(2): p. 375-6.
3. Cervantes F., A. Alvarez-Larran, C. Talarn, M. Gomez and E. Montserrat, *Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients*. Br J Haematol, 2002. **118**(3): p. 786-90.
4. Tefferi A., *Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1*. Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1128-38.
5. Oh S.T. and J. Gotlib, *JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(3): p. 323-37.
6. Tefferi A. and J.W. Vardiman, *Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 14-22.
7. Barosi G., R.A. Mesa, J. Thiele, F. Cervantes, P.J. Campbell, S. Verstovsek, *et al.*, *Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*. Leukemia, 2008. **22**(2): p. 437-8.
8. Mesa R.A., M.N. Silverstein, S.J. Jacobsen, P.C. Wollan and A. Tefferi, *Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995*. Am J Hematol, 1999. **61**(1): p. 10-5.
9. Ania B.J., V.J. Suman, J.L. Sobell, M.B. Codd, M.N. Silverstein and L.J. Melton, 3rd, *Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989*. Am J Hematol, 1994. **47**(2): p. 89-93.
10. Adamson J.W., P.J. Fialkow, S. Murphy, J.F. Prchal and L. Steinmann, *Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease*. N Engl J Med, 1976. **295**(17): p. 913-6.
11. Jacobson R.J., A. Salo and P.J. Fialkow, *Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis*. Blood, 1978. **51**(2): p. 189-94.
12. Renneville A., B. Quesnel, A. Charpentier, L. Terriou, A. Crinquette, J.L. Lai, *et al.*, *High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2067-70.

13. Landgren O., L.R. Goldin, S.Y. Kristinsson, E.A. Helgadóttir, J. Samuelsson and M. Björkholm, *Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2199-204.
14. Pardanani A., B.L. Fridley, T.L. Lasho, D.G. Gilliland and A. Tefferi, *Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2785-9.
15. Beer P.A., F. Delhommeau, J.P. LeCouedic, M.A. Dawson, E. Chen, D. Bareford, *et al.*, *Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm*. *Blood*, 2010. **115**(14): p. 2891-900.
16. Jones A.V., A. Chase, R.T. Silver, D. Oscier, K. Zoi, Y.L. Wang, *et al.*, *JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms*. *Nat Genet*, 2009. **41**(4): p. 446-9.
17. Patnaik M.M., T.L. Lasho, C.M. Finke, N. Gangat, D. Caramazza, S. Siragusa, *et al.*, *MPL mutation effect on JAK2 46/1 haplotype frequency in JAK2V617F-negative myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2010. **24**(4): p. 859-60.
18. Tefferi A., T.L. Lasho, M.M. Patnaik, C.M. Finke, K. Hussein, W.J. Hogan, *et al.*, *JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival*. *Leukemia*, 2010. **24**(1): p. 105-9.
19. Pardanani A., T.L. Lasho, C.M. Finke, N. Gangat, A.P. Wolanskyj, C.A. Hanson, *et al.*, *The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients*. *Leukemia*, 2010. **24**(1): p. 110-4.
20. Tefferi A., *Primary myelofibrosis: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. *Am J Hematol*, 2011. **86**(12): p. 1017-26.
21. Goh K.C., V. Novotny-Diermayr, S. Hart, L.C. Ong, Y.K. Loh, A. Cheong, *et al.*, *TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties*. *Leukemia*, 2012. **26**(2): p. 236-43.
22. Kralovics R., *Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2008. **22**(10): p. 1841-8.
23. Lasho T.L., C.M. Finke, C.A. Hanson, T. Jimma, R.A. Knudson, R.P. Ketterling, *et al.*, *SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients*. *Leukemia*, 2012. **26**(5): p. 1135-7.

24. Lasho T.L., A. Pardanani and A. Tefferi, *LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis*. N Engl J Med, 2010. **363**(12): p. 1189-90.
25. Parganas E., D. Wang, D. Stravopodis, D.J. Topham, J.C. Marine, S. Teglund, *et al.*, *Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors*. Cell, 1998. **93**(3): p. 385-95.
26. Ihle J.N. and D.G. Gilliland, *Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(1): p. 8-14.
27. Kisseleva T., S. Bhattacharya, J. Braunstein and C.W. Schindler, *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
28. Valentino L. and J. Pierre, *JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(6): p. 713-21.
29. Moliterno A.R., W.D. Hankins and J.L. Spivak, *Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera*. N Engl J Med, 1998. **338**(9): p. 572-80.
30. Roder S., C. Steimle, G. Meinhardt and H.L. Pahl, *STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera*. Exp Hematol, 2001. **29**(6): p. 694-702.
31. Komura E., H. Chagraoui, V. Mansat de Mas, B. Blanchet, P. de Sepulveda, F. Larbret, *et al.*, *Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression*. Exp Hematol, 2003. **31**(7): p. 622-30.
32. Prchal J.F. and A.A. Axelrad, *Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera*. N Engl J Med, 1974. **290**(24): p. 1382.
33. Lutton J.D. and R.D. Levere, *Endogenous erythroid colony formation by peripheral blood mononuclear cells from patients with myelofibrosis and polycythemia vera*. Acta Haematol, 1979. **62**(2): p. 94-9.
34. Gilliland D.G., K.L. Blanchard, J. Levy, S. Perrin and H.F. Bunn, *Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6848-52.
35. el Kassas N., G. Hetet, Y. Li, J. Briere and B. Grandchamp, *Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia*. Br J Haematol, 1995. **90**(1): p. 131-7.
36. Briere J.B., *Essential thrombocythemia*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 3.
37. Landolfi R., L. Di Gennaro and A. Falanga, *Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation*. Leukemia, 2008. **22**(11): p. 2020-8.

38. *Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years.* Gruppo Italiano Studio Policitemia. Ann Intern Med, 1995. **123**(9): p. 656-64.
39. Passamonti F., E. Brusamolino, M. Lazzarino, C. Barate, C. Klersy, E. Orlandi, *et al.*, *Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: long-term results in 163 patients.* Haematologica, 2000. **85**(10): p. 1011-8.
40. Marchioli R., G. Finazzi, R. Landolfi, J. Kutti, H. Gisslinger, C. Patrono, *et al.*, *Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera.* J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2224-32.
41. Gangat N., J. Strand, C.Y. Li, W. Wu, A. Pardanani and A. Tefferi, *Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation.* Br J Haematol, 2007. **138**(3): p. 354-8.
42. Chim C.S., Y.L. Kwong, A.K. Lie, S.K. Ma, C.C. Chan, L.G. Wong, *et al.*, *Long-term outcome of 231 patients with essential thrombocythemia: prognostic factors for thrombosis, bleeding, myelofibrosis, and leukemia.* Arch Intern Med, 2005. **165**(22): p. 2651-8.
43. Besses C., F. Cervantes, A. Pereira, L. Florensa, F. Sole, J.C. Hernandez-Boluda, *et al.*, *Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients.* Leukemia, 1999. **13**(2): p. 150-4.
44. Wolanskyj A.P., S.M. Schwager, R.F. McClure, D.R. Larson and A. Tefferi, *Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors.* Mayo Clin Proc, 2006. **81**(2): p. 159-66.
45. Jensen M.K., P. de Nully Brown, O.J. Nielsen and H.C. Hasselbalch, *Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area.* Eur J Haematol, 2000. **65**(2): p. 132-9.
46. Campbell P.J., L.M. Scott, G. Buck, K. Wheatley, C.L. East, J.T. Marsden, *et al.*, *Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study.* Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1945-53.
47. Carobbio A., G. Finazzi, V. Guerini, O. Spinelli, F. Delaini, R. Marchioli, *et al.*, *Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status.* Blood, 2007. **109**(6): p. 2310-3.
48. Briere J.B., *Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: diagnosis and management.* Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(3): p. 208-18.
49. Passamonti F., E. Rumi, E. Pungolino, L. Malabarba, P. Bertazzoni, M. Valentini, *et al.*, *Life expectancy and prognostic factors for survival in patients*



- with polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Am J Med, 2004. **117**(10): p. 755-61.
50. Rozman C., M. Giralt, E. Feliu, D. Rubio and M.T. Cortes, *Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders*. Cancer, 1991. **67**(10): p. 2658-63.
51. Antonioli E., P. Guglielmelli, A. Pancrazzi, C. Bogani, M. Verrucci, V. Ponziani, *et al.*, *Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia*. Leukemia, 2005. **19**(10): p. 1847-9.
52. Bazzan M., G. Tamponi, P. Schinco, A. Vaccarino, C. Foli, G. Gallone, *et al.*, *Thrombosis-free survival and life expectancy in 187 consecutive patients with essential thrombocythemia*. Ann Hematol, 1999. **78**(12): p. 539-43.
53. Tefferi A., R. Fonseca, D.L. Pereira and H.C. Hoagland, *A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia*. Mayo Clin Proc, 2001. **76**(1): p. 22-8.
54. Cortelazzo S., P. Viero, G. Finazzi, A. D'Emilio, F. Rodeghiero and T. Barbui, *Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia*. J Clin Oncol, 1990. **8**(3): p. 556-62.
55. Regev A., P. Stark, D. Blickstein and M. Lahav, *Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts*. Am J Hematol, 1997. **56**(3): p. 168-72.
56. Cortelazzo S., G. Finazzi, M. Ruggeri, O. Vestri, M. Galli, F. Rodeghiero, *et al.*, *Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis*. N Engl J Med, 1995. **332**(17): p. 1132-6.
57. Shih L.Y., T.L. Lin, C.L. Lai, P. Dunn, J.H. Wu, P.N. Wang, *et al.*, *Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1596-601.
58. Griesshammer M., S. Klippel, E. Strunck, S. Temerinac, U. Mohr, H. Heimpel, *et al.*, *PRV-1 mRNA expression discriminates two types of essential thrombocythemia*. Ann Hematol, 2004. **83**(6): p. 364-70.
59. Landolfi R., G. Ciabattini, P. Patrignani, M.A. Castellana, E. Pogliani, B. Bizzi, *et al.*, *Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo*. Blood, 1992. **80**(8): p. 1965-71.
60. Wautier J.L., R.C. Paton, M.P. Wautier, D. Pintigny, E. Abadie, P. Passa, *et al.*, *Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications*. N Engl J Med, 1981. **305**(5): p. 237-42.

61. Landolfi R., B. Rocca and C. Patrono, *Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **20**(3): p. 203-22.
62. Elliott M.A. and A. Tefferi, *Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia*. Br J Haematol, 2005. **128**(3): p. 275-90.
63. Landolfi R. and R. Marchioli, *European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): a randomized trial*. Semin Thromb Hemost, 1997. **23**(5): p. 473-8.
64. Falanga A., M. Marchetti, T. Barbui and C.W. Smith, *Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils*. Semin Hematol, 2005. **42**(4): p. 239-47.
65. Afshar-Kharghan V. and P. Thiagarajan, *Leukocyte adhesion and thrombosis*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(1): p. 34-9.
66. Li N., A.H. Goodall and P. Hjendahl, *A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates*. Br J Haematol, 1997. **99**(4): p. 808-16.
67. Ott I., F.J. Neumann, M. Gawaz, M. Schmitt and A. Schomig, *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-46.
68. Falanga A., M. Marchetti, A. Vignoli, D. Balducci and T. Barbui, *Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Exp Hematol, 2005. **33**(5): p. 523-30.
69. Landolfi R., R. Marchioli, J. Kutti, H. Gisslinger, G. Tognoni, C. Patrono, *et al.*, *Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera*. N Engl J Med, 2004. **350**(2): p. 114-24.
70. Le Bousse-Kerdiles M.C. and M.C. Martyre, *Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis*. Ann Hematol, 1999. **78**(10): p. 437-44.
71. Messinezy M., N.B. Westwood, I. El-Hemaidi, J.T. Marsden, R.S. Sherwood and T.C. Pearson, *Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia*. Br J Haematol, 2002. **117**(1): p. 47-53.
72. Tefferi A., *Myelofibrosis with myeloid metaplasia*. N Engl J Med, 2000. **342**(17): p. 1255-65.
73. Ribera J.M., J. Blade, F. Cervantes, E. Feliu, J. Sierra, R. Bragues, *et al.*, *[Osteolytic lesions in idiopathic myelofibrosis: presentation of 2 cases]*. Med Clin (Barc), 1983. **81**(19): p. 861-4.

74. Koch C.A., C.Y. Li, R.A. Mesa and A. Tefferi, *Nonhepatosplenic extramedullary hematopoiesis: associated diseases, pathology, clinical course, and treatment*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(10): p. 1223-33.
75. Barosi G., A. Ambrosetti, C. Finelli, A. Grossi, P. Leoni, N.L. Liberato, *et al.*, *The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia*. Br J Haematol, 1999. **104**(4): p. 730-7.
76. Passamonti F., E. Rumi, M. Caramella, C. Elena, L. Arcaini, E. Boveri, *et al.*, *A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3383-7.
77. Barosi G., G. Viarengo, A. Pecci, V. Rosti, G. Piaggio, M. Marchetti, *et al.*, *Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3249-55.
78. Passamonti F., L. Vanelli, L. Malabarba, E. Rumi, E. Pungolino, L. Malcovati, *et al.*, *Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders*. Haematologica, 2003. **88**(10): p. 1123-9.
79. Spivak J.L., *Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4272-90.
80. Dingli D., S.M. Schwager, R.A. Mesa, C.Y. Li, G.W. Dewald and A. Tefferi, *Presence of unfavorable cytogenetic abnormalities is the strongest predictor of poor survival in secondary myelofibrosis*. Cancer, 2006. **106**(9): p. 1985-9.
81. Dupriez B., P. Morel, J.L. Demory, J.L. Lai, M. Simon, I. Plantier, *et al.*, *Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system*. Blood, 1996. **88**(3): p. 1013-8.
82. Cervantes F., A. Pereira, J. Esteve, M. Rafel, F. Cobo, C. Rozman, *et al.*, *Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis*. Br J Haematol, 1997. **97**(3): p. 635-40.
83. Thiele J. and H.M. Kvasnicka, *Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(3): p. 219-30.
84. Thiele J., H.M. Kvasnicka, R. Zankovich and V. Diehl, *Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis*. Haematologica, 2000. **85**(11): p. 1126-34.
85. Passamonti F., E. Rumi, L. Arcaini, E. Boveri, C. Elena, D. Pietra, *et al.*, *Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients*. Haematologica, 2008. **93**(11): p. 1645-51.

86. Beer P.A., W.N. Erber, P.J. Campbell and A.R. Green, *How I treat essential thrombocythemia*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1472-82.
87. Peter J. Campbell and Anthony R. Green, F.Med.Sci., *The Myeloproliferative Disorders*. The new england journal of medicine, 2006. **355**(23):p. 2452-66.
88. Harrison C.N., P.J. Campbell, G. Buck, K. Wheatley, C.L. East, D. Bareford, *et al.*, *Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(1): p. 33-45.
89. Okamura T., N. Kinukawa, Y. Niho and H. Mizoguchi, *Primary chronic myelofibrosis: clinical and prognostic evaluation in 336 Japanese patients*. Int J Hematol, 2001. **73**(2): p. 194-8.
90. Cervantes F., D. Tassies, C. Salgado, M. Rovira, A. Pereira and C. Rozman, *Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients*. Acta Haematol, 1991. **85**(3): p. 124-7.
91. Spivak J.L., G. Barosi, G. Tognoni, T. Barbui, G. Finazzi, R. Marchioli, *et al.*, *Chronic myeloproliferative disorders*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 200-24.
92. Andersson P.O., B. Ridell, H. Wadenvik and J. Kutti, *Leukemic transformation of essential thrombocythemia without previous cytoreductive treatment*. Ann Hematol, 2000. **79**(1): p. 40-2.
93. Sterkers Y., C. Preudhomme, J.L. Lai, J.L. Demory, M.T. Caulier, E. Wattel, *et al.*, *Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion*. Blood, 1998. **91**(2): p. 616-22.
94. Sierra J., F. Cervantes, E. Feliu and C. Rozman, *[Essential thrombocythemia developing into acute leukemia]*. Med Clin (Barc), 1983. **81**(13): p. 580-3.
95. Mesa R.A., C.Y. Li, R.P. Ketterling, G.S. Schroeder, R.A. Knudson and A. Tefferi, *Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases*. Blood, 2005. **105**(3): p. 973-7.
96. Baudard M., A. Beauchamp-Nicoud, A. Delmer, B. Rio, C. Blanc, R. Zittoun, *et al.*, *Has the prognosis of adult patients with acute myeloid leukemia improved over years? A single institution experience of 784 consecutive patients over a 16-year period*. Leukemia, 1999. **13**(10): p. 1481-90.
97. Tefferi A., R.A. Mesa, G. Schroeder, C.A. Hanson, C.Y. Li and G.W. Dewald, *Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 763-71.
98. Sun H. and N.K. Tonks, *The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 480-5.

99. Blume-Jensen P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
100. Schlessinger J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
101. Robinson D.R., Y.M. Wu and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
102. Rane S.G. and E.P. Reddy, *Janus kinases: components of multiple signaling pathways*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5662-79.
103. Yamaoka K., P. Saharinen, M. Pesu, V.E. Holt, 3rd, O. Silvennoinen and J.J. O'Shea, *The Janus kinases (Jaks)*. Genome Biol, 2004. **5**(12): p. 253.
104. Roskoski R., Jr., *Src protein-tyrosine kinase structure and regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(4): p. 1155-64.
105. Rane S.G. and E.P. Reddy, *JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3334-58.
106. Wilks A.F., *Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(5): p. 1603-7.
107. Firmbach-Kraft I., M. Byers, T. Shows, R. Dalla-Favera and J.J. Krolewski, *tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes*. Oncogene, 1990. **5**(9): p. 1329-36.
108. Wilks A.F., A.G. Harpur, R.R. Kurban, S.J. Ralph, G. Zurcher and A. Ziemiecki, *Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 2057-65.
109. Duarte R.F. and D.A. Frank, *[The JAK-STAT signaling pathway and its role in oncogenesis, immunomodulation and development]*. Med Clin (Barc), 2000. **114**(6): p. 227-34.
110. Muller M., J. Briscoe, C. Laxton, D. Guschin, A. Ziemiecki, O. Silvennoinen, *et al.*, *The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction*. Nature, 1993. **366**(6451): p. 129-35.
111. Yeh T.C. and S. Pellegrini, *The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(12): p. 1523-34.
112. Kerr I.M., A.P. Costa-Pereira, B.F. Lillemeier and B. Strobl, *Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 1-5.
113. Shuai K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn and J.E. Darnell, Jr., *Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves*

- dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions.* Cell, 1994. **76**(5): p. 821-8.
114. Darnell J.E., Jr., I.M. Kerr and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
115. Schlessinger J., *SH2/SH3 signaling proteins.* Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 25-30.
116. Belka C., M.A. Brach and F. Herrmann, *The role of tyrosine kinases and their substrates in signal transmission of hematopoietic growth factors: a short review.* Leukemia, 1995. **9**(5): p. 754-61.
117. Ihle J.N., *Janus kinases in cytokine signalling.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1336): p. 159-66.
118. Colamonici O.R., H. Uyttendaele, P. Domanski, H. Yan and J.J. Krolewski, *p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor.* J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3518-22.
119. Kotenko S.V., L.S. Izotova, B.P. Pollack, T.M. Mariano, R.J. Donnelly, G. Muthukumar, *et al.*, *Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 20915-21.
120. Witthuhn B.A., F.W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura, *et al.*, *JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin.* Cell, 1993. **74**(2): p. 227-36.
121. Silvennoinen O., B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, J.L. Cleveland, T. Yi and J.N. Ihle, *Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8429-33.
122. Shuai K., A. Ziemiecki, A.F. Wilks, A.G. Harpur, H.B. Sadowski, M.Z. Gilman, *et al.*, *Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins.* Nature, 1993. **366**(6455): p. 580-3.
123. Park O.K., T.S. Schaefer and D. Nathans, *In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13704-8.
124. Garattini E., L. Mologni, I. Ponzanelli and M. Terao, *Cross-talk between retinoic acid and interferons: molecular mechanisms of interaction in acute promyelocytic leukemia cells.* Leuk Lymphoma, 1998. **30**(5-6): p. 467-75.
125. Starr R. and D.J. Hilton, *Negative regulation of the JAK/STAT pathway.* Bioessays, 1999. **21**(1): p. 47-52.



126. Shuai K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.
127. Sasaki A., H. Yasukawa, T. Shouda, T. Kitamura, I. Dikic and A. Yoshimura, *CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29338-47.
128. Stofega M.R., J. Herrington, N. Billestrup and C. Carter-Su, *Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(9): p. 1338-50.
129. Bersenev A., C. Wu, J. Balcerek, J. Jing, M. Kundu, G.A. Blobel, *et al.*, *Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice*. J Clin Invest. **120**(6): p. 2058-69.
130. Vannucchi A.M., P. Guglielmelli and A. Tefferi, *Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(3): p. 171-91.
131. Macchi P., A. Villa, S. Giliani, M.G. Sacco, A. Frattini, F. Porta, *et al.*, *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID)*. Nature, 1995. **377**(6544): p. 65-8.
132. Kaplan M.H. and M.J. Grusby, *Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 2-5.
133. Baxter E.J., L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, *et al.*, *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
134. James C., V. Ugo, J.P. Le Couedic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, *et al.*, *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
135. Kralovics R., F. Passamonti, A.S. Buser, S.S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, *et al.*, *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders*. N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
136. Levine R.L., M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J. Huntly, *et al.*, *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*. Cancer Cell, 2005. **7**(4): p. 387-97.
137. Atallah E., R. Nussenzveig, C.C. Yin, C. Bueso-Ramos, C. Tam, T. Manshouri, *et al.*, *Prognostic interaction between thrombocytosis and JAK2 V617F mutation in the WHO subcategories of myelodysplastic/myeloproliferative disease-unclassifiable and refractory anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis*. Leukemia, 2008. **22**(6): p. 1295-8.
138. Peeters P., S.D. Raynaud, J. Cools, I. Wlodarska, J. Grosgeorge, P. Philip, *et al.*, *Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated*

- kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia.* Blood, 1997. **90**(7): p. 2535-40.
139. Hussein K., O. Bock, K. Theophile, A. Seegers, H. Arps, O. Basten, *et al.*, *Chronic myeloproliferative diseases with concurrent BCR-ABL junction and JAK2V617F mutation.* Leukemia, 2008. **22**(5): p. 1059-62.
  140. Kilpivaara O. and R.L. Levine, *JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science.* Leukemia, 2008. **22**(10): p. 1813-7.
  141. Jamieson C.H., J. Gotlib, J.A. Durocher, M.P. Chao, M.R. Mariappan, M. Lay, *et al.*, *The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6224-9.
  142. Tefferi A. and D.G. Gilliland, *Oncogenes in myeloproliferative disorders.* Cell Cycle, 2007. **6**(5): p. 550-66.
  143. Scott L.M., W. Tong, R.L. Levine, M.A. Scott, P.A. Beer, M.R. Stratton, *et al.*, *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis.* N Engl J Med, 2007. **356**(5): p. 459-68.
  144. Scott L.M., P.A. Beer, A.J. Bench, W.N. Erber and A.R. Green, *Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera.* Br J Haematol, 2007. **139**(3): p. 511-2.
  145. Pietra D., S. Li, A. Brisci, F. Passamonti, E. Rumi, A. Theocharides, *et al.*, *Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1686-9.
  146. Pardanani A., T.L. Lasho, C. Finke, C.A. Hanson and A. Tefferi, *Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera.* Leukemia, 2007. **21**(9): p. 1960-3.
  147. Butcher C.M., U. Hahn, L.B. To, J. Gecz, E.J. Wilkins, H.S. Scott, *et al.*, *Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients.* Leukemia, 2008. **22**(4): p. 870-3.
  148. Tefferi A., J. Thiele, A. Orazi, H.M. Kvasnicka, T. Barbui, C.A. Hanson, *et al.*, *Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel.* Blood, 2007. **110**(4): p. 1092-7.
  149. Passamonti F., F. Cervantes, A.M. Vannucchi, E. Morra, E. Rumi, A. Pereira, *et al.*, *A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment).* Blood, 2010. **115**(9): p. 1703-8.



150. Arcasoy M.O., K.W. Harris and B.G. Forget, *A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation*. Exp Hematol, 1999. **27**(1): p. 63-74.
151. Arcasoy M.O., B.A. Degar, K.W. Harris and B.G. Forget, *Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene*. Blood, 1997. **89**(12): p. 4628-35.
152. Kralovics R., K. Indrak, T. Stopka, B.W. Berman, J.F. Prchal and J.T. Prchal, *Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia*s. Blood, 1997. **90**(5): p. 2057-61.
153. Pikman Y., B.H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B.L. Ebert, M. Gozo, *et al.*, *MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. PLoS Med, 2006. **3**(7): p. e270.
154. Pardanani A.D., R.L. Levine, T. Lasho, Y. Pikman, R.A. Mesa, M. Wadleigh, *et al.*, *MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3472-6.
155. Oh S.T., and J. Gotlib, *JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms*. Expert Rev. Hematol, 2010. **3**(3):p. 323-37.
156. Guglielmelli P., A. Pancrazzi, G. Bergamaschi, V. Rosti, L. Villani, E. Antonioli, *et al.*, *Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation*. Br J Haematol, 2007. **137**(3): p. 244-7.
157. Beer P.A., P.J. Campbell, L.M. Scott, A.J. Bench, W.N. Erber, D. Bareford, *et al.*, *MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort*. Blood, 2008. **112**(1): p. 141-9.
158. Tefferi A., *Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 240-5.
159. Dameshek W., *Some speculations on the myeloproliferative syndromes*. Blood, 1951. **6**(4): p. 372-5.
160. Fialkow P.J., *Cell lineages in hematopoietic neoplasia studied with glucose-6-phosphate dehydrogenase cell markers*. J Cell Physiol Suppl, 1982. **1**: p. 37-43.
161. Wilkins B.S., W.N. Erber, D. Bareford, G. Buck, K. Wheatley, C.L. East, *et al.*, *Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes*. Blood, 2008. **111**(1): p. 60-70.
162. Thiele J., H.M. Kvasnicka and J. Vardiman, *Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl*. Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(3): p. 413-37.

163. Harrison c., *Rethinking Disease Definitions and Therapeutic Strategies in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera.* , 2010.
164. Tefferi A. and G. Gilliland, *Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system.* Best Pract Res Clin Haematol, 2006. **19**(3): p. 365-85.
165. Lippert E., M. Boissinot, R. Kralovics, F. Girodon, I. Dobo, V. Praloran, *et al.*, *The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.* Blood, 2006. **108**(6): p. 1865-7.
166. Beer P.A., A.V. Jones, A.J. Bench, A. Goday-Fernandez, E.M. Boyd, K.J. Vaghela, *et al.*, *Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones.* Br J Haematol, 2009. **144**(6): p. 904-8.
167. Carobbio A., G. Finazzi, E. Antonioli, P. Guglielmelli, A.M. Vannucchi, C.M. Dellacasa, *et al.*, *JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera.* Exp Hematol, 2009. **37**(9): p. 1016-21.
168. Dahabreh I.J., K. Zoi, S. Giannouli, C. Zoi, D. Loukopoulos and M. Voulgarelis, *Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia.* Leuk Res, 2009. **33**(1): p. 67-73.
169. Kilpivaara O., S. Mukherjee, A.M. Schram, M. Wadleigh, A. Mullally, B.L. Ebert, *et al.*, *A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms.* Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 455-9.
170. Delhommeau F., S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Masse, *et al.*, *Mutation in TET2 in myeloid cancers.* N Engl J Med, 2009. **360**(22): p. 2289-301.
171. Pich A., L. Riera, F. Sismondi, L. Godio, L. Davico Bonino, F. Marmont, *et al.*, *JAK2V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia.* J Clin Pathol, 2009. **62**(9): p. 798-801.
172. Griesshammer M., M. Bangerter, T. Sauer, R. Wennauer, L. Bergmann and H. Heimpel, *Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count.* J Intern Med, 1999. **245**(3): p. 295-300.
173. Bench A.J., E.P. Nacheva, K.M. Champion and A.R. Green, *Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders.* Baillieres Clin Haematol, 1998. **11**(4): p. 819-48.

174. Harrison C.N., D. Bareford, N. Butt, P. Campbell, E. Conneally, M. Drummond, *et al.*, *Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis*. Br J Haematol, 2010. **149**(3): p. 352-75.
175. Beer P.A. and A.R. Green, *Pathogenesis and management of essential thrombocythemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 621-8.
176. Spivak J.L. and R.T. Silver, *The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal*. Blood, 2008. **112**(2): p. 231-9.
177. Cassinat B., C. Laguillier, C. Gardin, V. de Beco, S. Burcheri, P. Fenaux, *et al.*, *Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass?* Leukemia, 2008. **22**(2): p. 452-3.
178. Vannucchi A.M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, A. Pardanani and A. Tefferi, *Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal*. Leukemia, 2008. **22**(7): p. 1299-307.
179. Thiele J. and H.M. Kvasnicka, *Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients*. Ann Hematol, 2003. **82**(3): p. 148-52.
180. Campbell P.J., D. Bareford, W.N. Erber, B.S. Wilkins, P. Wright, G. Buck, *et al.*, *Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy*. J Clin Oncol, 2009. **27**(18): p. 2991-9.
181. Tefferi A. and D.G. Gilliland, *The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis*. Mayo Clin Proc, 2005. **80**(7): p. 947-58.
182. Sirhan S., V.F. Fairbanks and A. Tefferi, *Red cell mass and plasma volume measurements in polycythemia: evaluation of performance and practical utility*. Cancer, 2005. **104**(1): p. 213-5.
183. Andreasson B., E. Lofvenberg and J. Westin, *Management of patients with polycythaemia vera: results of a survey among Swedish haematologists*. Eur J Haematol, 2005. **74**(6): p. 489-95.
184. Prchal J.T. and V. Divoky, *Lessons to better understanding of hypoxia sensing. Acquired and congenital mutations resulting in polycythemia*. Adv Exp Med Biol, 2001. **502**: p. 189-205.
185. Diez-Martin J.L., D.L. Graham, R.M. Petitt and G.W. Dewald, *Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera*. Mayo Clin Proc, 1991. **66**(3): p. 287-99.
186. Tefferi A., *Polycythemia vera: a comprehensive review and clinical recommendations*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(2): p. 174-94.

187. Dobo I., P. Mossuz, L. Campos, F. Girodon, A. Allegraud, V. Latger-Cannard, *et al.*, *Comparison of four serum-free, cytokine-free media for analysis of endogenous erythroid colony growth in polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Hematol J, 2001. **2**(6): p. 396-403.
188. Tefferi A., S.Y. Yoon and C.Y. Li, *Immunohistochemical staining for megakaryocyte c-mpl may complement morphologic distinction between polycythemia vera and secondary erythrocytosis*. Blood, 2000. **96**(2): p. 771-2.
189. Klippel S., E. Strunck, S. Temerinac, A.J. Bench, G. Meinhardt, U. Mohr, *et al.*, *Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3569-74.
190. Koch C.A., T.L. Lasho and A. Tefferi, *Platelet-rich plasma serotonin levels in chronic myeloproliferative disorders: evaluation of diagnostic use and comparison with the neutrophil PRV-1 assay*. Br J Haematol, 2004. **127**(1): p. 34-9.
191. Cesar J.M., D. de Miguel, A. Garcia Avello and C. Burgaleta, *Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, PFA-100*. Am J Clin Pathol, 2005. **123**(5): p. 772-7.
192. Mesa R.A., S. Verstovsek, F. Cervantes, G. Barosi, J.T. Reilly, B. Dupriez, *et al.*, *Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT)*. Leuk Res, 2007. **31**(6): p. 737-40.
193. Cervantes F., B. Dupriez, A. Pereira, F. Passamonti, J.T. Reilly, E. Morra, *et al.*, *New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*. Blood, 2009. **113**(13): p. 2895-901.
194. Tefferi A., D. Dingli, C.Y. Li and R.A. Mesa, *Microcytosis in agnogenic myeloid metaplasia: prevalence and clinical correlates*. Leuk Res, 2006. **30**(6): p. 677-80.
195. Kvasnicka H.M. and J. Thiele, *Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification*. Am J Hematol, 2010. **85**(1): p. 62-9.
196. Barbui T., J. Thiele, F. Passamonti, E. Rumi, E. Boveri, M. Ruggeri, *et al.*, *Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(23): p. 3179-84.
197. Thiele J., H.M. Kvasnicka, F. Facchetti, V. Franco, J. van der Walt and A. Orazi, *European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity*. Haematologica, 2005. **90**(8): p. 1128-32.

198. Steensma D.P., C.A. Hanson, L. Letendre and A. Tefferi, *Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity?* Leuk Res, 2001. **25**(10): p. 829-38.
199. Orazi A., D.P. O'Malley, J. Jiang, G.H. Vance, J. Thomas, M. Czader, *et al.*, *Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia.* Mod Pathol, 2005. **18**(5): p. 603-14.
200. Bacher U., S. Schnittger, W. Kern, T. Weiss, T. Haferlach and C. Haferlach, *Distribution of cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes, Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms, and the overlap MDS/MPN category.* Ann Hematol, 2009. **88**(12): p. 1207-13.
201. Hussein K., D.L. Van Dyke and A. Tefferi, *Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion.* Eur J Haematol, 2009. **82**(5): p. 329-38.
202. Steensma D.P., G.W. Dewald, T.L. Lasho, H.L. Powell, R.F. McClure, R.L. Levine, *et al.*, *The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes.* Blood, 2005. **106**(4): p. 1207-9.
203. Tefferi A., *Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: current management and the prospect of targeted therapy.* Am J Hematol, 2008. **83**(6): p. 491-7.
204. Passamonti F., F. Cervantes, A.M. Vannucchi, E. Morra, E. Rumi, M. Cazzola, *et al.*, *Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis.* Blood, 2010. **116**(15): p. 2857-8.
205. Hussein K., A.D. Pardanani, D.L. Van Dyke, C.A. Hanson and A. Tefferi, *International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis.* Blood, 2010. **115**(3): p. 496-9.
206. Caramazza D., K.H. Begna, N. Gangat, R. Vaidya, S. Siragusa, D.L. Van Dyke, *et al.*, *Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients.* Leukemia, 2011. **25**(1): p. 82-8.
207. Tefferi A., S. Siragusa, K. Hussein, S.M. Schwager, C.A. Hanson, A. Pardanani, *et al.*, *Transfusion-dependency at presentation and its acquisition in the first year of diagnosis are both equally detrimental for survival in primary myelofibrosis--prognostic relevance is independent of IPSS or karyotype.* Am J Hematol, 2010. **85**(1): p. 14-7.
208. Elena C., F. Passamonti, E. Rumi, L. Malcovati, L. Arcaini, E. Boveri, *et al.*, *Red blood cell transfusion-dependency implies a poor survival in primary myelofibrosis irrespective of IPSS and DIPSS.* Haematologica, 2011. **96**(1): p. 167-70.



209. Patnaik M.M., D. Caramazza, N. Gangat, C.A. Hanson, A. Pardanani and A. Tefferi, *Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival*. Eur J Haematol, 2010. **84**(2): p. 105-8.
210. Gangat N., D. Caramazza, R. Vaidya, G. George, K. Begna, S. Schwager, *et al.*, *DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status*. J Clin Oncol, 2011. **29**(4): p. 392-7.
211. Tefferi A., T. Jimma, N. Gangat, R. Vaidya, K.H. Begna, C.A. Hanson, *et al.*, *Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4595-8.
212. Tefferi A., T.L. Lasho, J. Huang, C. Finke, R.A. Mesa, C.Y. Li, *et al.*, *Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 756-61.
213. Guglielmelli P., G. Barosi, G. Specchia, A. Rambaldi, F. Lo Coco, E. Antonioli, *et al.*, *Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1477-83.
214. Tefferi A., T.L. Lasho, O. Abdel-Wahab, P. Guglielmelli, J. Patel, D. Caramazza, *et al.*, *IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis*. Leukemia, 2010. **24**(7): p. 1302-9.
215. Guglielmelli P., F. Biamonte, J. Score, C. Hidalgo-Curtis, F. Cervantes, M. Maffioli, *et al.*, *EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis*. Blood, 2011. **118**(19): p. 5227-34.
216. Pardanani A., P. Guglielmelli, T.L. Lasho, A. Pancrazzi, C.M. Finke, A.M. Vannucchi, *et al.*, *Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1834-9.
217. Tefferi A., A. Pardanani, K.H. Lim, O. Abdel-Wahab, T.L. Lasho, J. Patel, *et al.*, *TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 905-11.
218. Tefferi A., R. Vaidya, D. Caramazza, C. Finke, T. Lasho and A. Pardanani, *Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1356-63.

219. Tam C.S., H. Kantarjian, J. Cortes, A. Lynn, S. Pierce, L. Zhou, *et al.*, *Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5587-93.
220. Huang J., C.Y. Li, R.A. Mesa, W. Wu, C.A. Hanson, A. Pardanani, *et al.*, *Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis*. Cancer, 2008. **112**(12): p. 2726-32.
221. Tefferi A., T.L. Lasho, S.M. Schwager, D.P. Steensma, R.A. Mesa, C.Y. Li, *et al.*, *The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates*. Br J Haematol, 2005. **131**(3): p. 320-8.
222. Campbell P.J., M. Griesshammer, K. Dohner, H. Dohner, R. Kusec, H.C. Hasselbalch, *et al.*, *V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2098-100.
223. Wolanskyj A.P., T.L. Lasho, S.M. Schwager, R.F. McClure, M. Wadleigh, S.J. Lee, *et al.*, *JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance*. Br J Haematol, 2005. **131**(2): p. 208-13.
224. Campbell P.J. and A.R. Green, *Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 201-8.
225. Tefferi A., T.L. Lasho, S.M. Schwager, J.S. Strand, M. Elliott, R. Mesa, *et al.*, *The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera*. Cancer, 2006. **106**(3): p. 631-5.
226. Mesa R.A., H. Powell, T. Lasho, G. Dewald, R. McClure and A. Tefferi, *JAK2(V617F) and leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia*. Leuk Res, 2006. **30**(11): p. 1457-60.
227. Barosi G., G. Bergamaschi, M. Marchetti, A.M. Vannucchi, P. Guglielmelli, E. Antonioli, *et al.*, *JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis*. Blood, 2007. **110**(12): p. 4030-6.
228. Kittur J., R.A. Knudson, T.L. Lasho, C.M. Finke, N. Gangat, A.P. Wolanskyj, *et al.*, *Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia*. Cancer, 2007. **109**(11): p. 2279-84.
229. Alvarez-Larran A., F. Cervantes, B. Bellosillo, M. Giralt, A. Julia, J.C. Hernandez-Boluda, *et al.*, *Essential thrombocythemia in young individuals: frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients*. Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1218-23.
230. Carobbio A., G. Finazzi, E. Antonioli, P. Guglielmelli, A.M. Vannucchi, F. Delaini, *et al.*, *Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3135-7.

231. Fenaux P., M. Simon, M.T. Caulier, J.L. Lai, J. Goudemand and F. Bauters, *Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases*. Cancer, 1990. **66**(3): p. 549-56.
232. Lussana F., S. Caberlon, C. Pagani, P.W. Kamphuisen, H.R. Buller and M. Cattaneo, *Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review*. Thromb Res, 2009. **124**(4): p. 409-17.
233. Alvarez-Larran A., F. Cervantes, A. Pereira, E. Arellano-Rodrigo, V. Perez-Andreu, J.C. Hernandez-Boluda, *et al.*, *Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1205-10; quiz 1387.
234. Finazzi G., V. Caruso, R. Marchioli, G. Capnist, T. Chisesi, C. Finelli, *et al.*, *Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2664-70.
235. Nielsen I. and H.C. Hasselbalch, *Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan*. Am J Hematol, 2003. **74**(1): p. 26-31.
236. Gangat N., A.P. Wolanskyj, R.F. McClure, C.Y. Li, S. Schwager, W. Wu, *et al.*, *Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 270-6.
237. Goldin L.R., M. Bjorkholm, S.Y. Kristinsson, J. Samuelsson and O. Landgren, *Germline and somatic JAK2 mutations and susceptibility to chronic myeloproliferative neoplasms*. Genome Med, 2009. **1**(5): p. 55.
238. Vassallo C., F. Passamonti, S. Merante, M. Ardigo, G. Nolli, S. Mangiacavalli, *et al.*, *Muco-cutaneous changes during long-term therapy with hydroxyurea in chronic myeloid leukaemia*. Clin Exp Dermatol, 2001. **26**(2): p. 141-8.
239. Liu L., S. Zhu, Z. Gong and B.C. Low, *K-ras/PI3K-Akt signaling is essential for zebrafish hematopoiesis and angiogenesis*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2850.
240. Lanzkron S., J.J. Strouse, R. Wilson, M.C. Beach, C. Haywood, H. Park, *et al.*, *Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease*. Ann Intern Med, 2008. **148**(12): p. 939-55.
241. Hanft V.N., S.R. Fruchtman, C.V. Pickens, W.F. Rosse, T.A. Howard and R.E. Ware, *Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3589-93.
242. Tibes R. and R.A. Mesa, *Blood consult: resistant and progressive essential thrombocythemia*. Blood, 2011. **118**(2): p. 240-2.



243. Barosi G., C. Besses, G. Birgegard, J. Briere, F. Cervantes, G. Finazzi, *et al.*, *A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 277-80.
244. Solberg L.A., Jr., A. Tefferi, K.J. Oles, J.S. Tarach, R.M. Petitt, L.A. Forstrom, *et al.*, *The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis*. Br J Haematol, 1997. **99**(1): p. 174-80.
245. Storen E.C. and A. Tefferi, *Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocythemia*. Blood, 2001. **97**(4): p. 863-6.
246. Giralt M., V. Navas, L. Hernandez-Nieto, C. Burgaleta, F. Carbonell, G. Ramirez, *et al.*, *[Retrospective analysis of the efficacy and tolerability of anagrelide in patients with essential thrombocythemia: Spanish registry of essential thrombocythemia]*. Med Clin (Barc), 2009. **133**(3): p. 86-90.
247. Gisslinger H G.M., Holowiecki J, *et al.*, *Final results of the ANAHYDRET-study: noninferiority of anagrelide compared to hydroxyurea in newly diagnosed WHO-essential thrombocythemia patients*. Blood, 2008. **112**(11):p.661.
248. Quintas-Cardama A., H. Kantarjian, T. Manshour, R. Luthra, Z. Estrov, S. Pierce, *et al.*, *Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera*. J Clin Oncol, 2009. **27**(32): p. 5418-24.
249. Kiladjian J.J., C. Chomienne and P. Fenaux, *Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms*. Leukemia, 2008. **22**(11): p. 1990-8.
250. Passamonti F., E. Rumi, L. Malabarba, L. Arcaini, E. Orlandi, E. Brusamolino, *et al.*, *Long-term follow-up of young patients with essential thrombocythemia treated with pipobroman*. Ann Hematol, 2004. **83**(8): p. 495-7.
251. Vardiman J.W., *The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms*. Chem Biol Interact. **184**(1-2): p. 16-20.
252. Tefferi A., G. Barosi, R.A. Mesa, F. Cervantes, H.J. Deeg, J.T. Reilly, *et al.*, *International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT)*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1497-503.
253. Scherber R., A.C. Dueck, P. Johansson, T. Barbui, G. Barosi, A.M. Vannucchi, *et al.*, *The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients*. Blood, 2011. **118**(2): p. 401-8.
254. Barosi G., G. Birgegard, G. Finazzi, M. Griesshammer, C. Harrison, H.C. Hasselbalch, *et al.*, *Response criteria for essential thrombocythemia and*

- polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference.* Blood, 2009. **113**(20): p. 4829-33.
255. Barosi G., D. Bordessoule, J. Briere, F. Cervantes, J.L. Demory, B. Dupriez, *et al.*, *Response criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of an initiative of the European Myelofibrosis Network (EUMNET).* Blood, 2005. **106**(8): p. 2849-53.
256. Livak K.J., *Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.* Genet Anal, 1999. **14**(5-6): p. 143-9.
257. Quintas-Cardama A., H. Kantarjian, J. Cortes and S. Verstovsek, *Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond.* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(2): p. 127-40.
258. Hayashi Y., *[Hereditary hematopoietic malignancy with emphasis of juvenile chronic myelogenous leukemia and 7 monosomy syndrome]*. Nihon Rinsho, 1995. **53**(11): p. 2737-41.
259. Tiedt R., H. Hao-Shen, M.A. Sobas, R. Looser, S. Dirnhofer, J. Schwaller, *et al.*, *Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice.* Blood, 2008. **111**(8): p. 3931-40.
260. Vannucchi A.M., *Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia.* Intern Emerg Med, 2010. **5**(3): p. 177-84.
261. Zhao R., S. Xing, Z. Li, X. Fu, Q. Li, S.B. Krantz, *et al.*, *Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera.* J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22788-92.
262. Jones A.V., S. Kreil, K. Zoi, K. Waghorn, C. Curtis, L. Zhang, *et al.*, *Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders.* Blood, 2005. **106**(6): p. 2162-8.
263. Cellai C., A. Laurenzana, E. Bianchi, S. Sdelci, R. Manfredini, A.M. Vannucchi, *et al.*, *Mechanistic insight into WEB-2170-induced apoptosis in human acute myelogenous leukemia cells: the crucial role of PTEN.* Exp Hematol, 2009. **37**(10): p. 1176-1185 e21.
264. Vannucchi A.M., P. Guglielmelli, A. Rambaldi, C. Bogani and T. Barbui, *Epigenetic therapy in myeloproliferative neoplasms: evidence and perspectives.* J Cell Mol Med, 2009. **13**(8A): p. 1437-50.
265. Scott L.M., M.A. Scott, P.J. Campbell and A.R. Green, *Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia.* Blood, 2006. **108**(7): p. 2435-7.
266. Antonioli E., P. Guglielmelli, G. Poli, C. Bogani, A. Pancrazzi, G. Longo, *et al.*, *Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia.* Haematologica, 2008. **93**(1): p. 41-8.

267. Olthof S.G., S. Fatrai, A.L. Drayer, M.R. Tyl, E. Vellenga and J.J. Schuringa, *Downregulation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in CD34+ cells promotes megakaryocytic development, whereas activation of STAT5 drives erythropoiesis*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1732-42.
268. Carobbio A., E. Antonioli, P. Guglielmelli, A.M. Vannucchi, F. Delaini, V. Guerini, *et al.*, *Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia*. J Clin Oncol, 2008. **26**(16): p. 2732-6.
269. Vannucchi A.M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, A. Rambaldi, G. Barosi, R. Marchioli, *et al.*, *Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia*. Blood, 2007. **110**(3): p. 840-6.
270. Vannucchi A.M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, G. Longo, A. Pancrazzi, V. Ponziani, *et al.*, *Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden*. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 1952-9.
271. Tefferi A., J.J. Strand, T.L. Lasho, R.A. Knudson, C.M. Finke, N. Gangat, *et al.*, *Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera*. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 2074-5.
272. Tefferi A., T.L. Lasho and G. Gilliland, *JAK2 mutations in myeloproliferative disorders*. N Engl J Med, 2005. **353**(13): p. 1416-7; author reply 1416-7.
273. Murphy S., *Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Semin Hematol, 1999. **36**(1 Suppl 2): p. 9-13.
274. Thiele J. and H.M. Kvasnicka, *A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(3): p. 381-96.
275. Tefferi A., S. Sirhan, T.L. Lasho, S.M. Schwager, C.Y. Li, D. Dingli, *et al.*, *Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia*. Br J Haematol, 2005. **131**(2): p. 166-71.
276. Levine R.L., C. Belisle, M. Wadleigh, D. Zahrieh, S. Lee, P. Chagnon, *et al.*, *X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4139-41.
277. Bellanne-Chantelot C., I. Chaumarel, M. Labopin, F. Bellanger, V. Barbu, C. De Toma, *et al.*, *Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders*. Blood, 2006. **108**(1): p. 346-52.

278. Verstovsek S., R.T. Silver, N.C. Cross and A. Tefferi, *JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, >90%, less?* Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2067.
279. Kiladjian J.J., B. Cassinat, P. Turlure, N. Cambier, M. Roussel, S. Bellucci, *et al.*, *High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2037-40.
280. Jones A.V., R.T. Silver, K. Waghorn, C. Curtis, S. Kreil, K. Zoi, *et al.*, *Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3339-41.
281. Remacha A.F., G. Puget, J.F. Nomdedeu, C. Estivill, M.P. Sarda and C. Canals, *[Evaluation of V617F mutation of JAK2 in negative chromosome Philadelphia chronic myeloproliferative disorders]*. Med Clin (Barc), 2006. **127**(16): p. 601-4.
282. Tefferi A., P. Noel and C.A. Hanson, *Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms a paper from the 2010 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology*. J Mol Diagn, 2011. **13**(5): p. 461-6.
283. Passamonti F., C. Elena, S. Schnittger, R.C. Skoda, A.R. Green, F. Girodon, *et al.*, *Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2813-6.
284. Passamonti F., E. Rumi, D. Pietra, C. Elena, E. Boveri, L. Arcaini, *et al.*, *A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications*. Leukemia, 2010. **24**(9): p. 1574-9.
285. Passamonti F., E. Rumi, C. Pascutto, M. Cazzola and M. Lazzarino, *Increase in leukocyte count over time predicts thrombosis in patients with low-risk essential thrombocythemia*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(9): p. 1587-9.
286. Carobbio A., J. Thiele, F. Passamonti, E. Rumi, M. Ruggeri, F. Rodeghiero, *et al.*, *Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients*. Blood, 2011. **117**(22): p. 5857-9.
287. Randi M.L., E. Ruzzon, F. Tezza, M. Scapin, E. Duner, R. Scandellari, *et al.*, *JAK2V617F mutation is common in old patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia*. Aging Clin Exp Res, 2011. **23**(1): p. 17-21.
288. Barbui T., A. Carobbio, F. Cervantes, A.M. Vannucchi, P. Guglielmelli, E. Antonioli, *et al.*, *Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors*. Blood, 2010. **115**(4): p. 778-82.

289. Politou M., C. Zoi, I.J. Dahabreh, L. Rallidis, A. Gialeraki, D. Loukopoulos, *et al.*, *No evidence of frequent association of the JAK2 V617F mutation with acute myocardial infarction in young patients*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 1008-9.
290. Falanga A., M. Marchetti, V. Evangelista, A. Vignoli, M. Licini, M. Balicco, *et al.*, *Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4261-6.
291. Arellano-Rodrigo E., A. Alvarez-Larran, J.C. Reverter, N. Villamor, D. Colomer and F. Cervantes, *Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status*. Haematologica, 2006. **91**(2): p. 169-75.
292. Passamonti F., L. Malabarba, E. Orlandi, C. Barate, A. Canevari, E. Brusamolino, *et al.*, *Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(1): p. 13-8.
293. Deeg H.J., T.A. Gooley, M.E. Flowers, G.E. Sale, J.T. Slattery, C. Anasetti, *et al.*, *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis*. Blood, 2003. **102**(12): p. 3912-8.
294. Rondelli D., G. Barosi, A. Bacigalupo, J.T. Prchal, U. Popat, E.P. Alessandrino, *et al.*, *Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia*. Blood, 2005. **105**(10): p. 4115-9.
295. Pardanani A., *JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 23-30.
296. Harrison C.N., *Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 409-15.
297. Spivak J.L., *Diagnosis of the myeloproliferative disorders: resolving phenotypic mimicry*. Semin Hematol, 2003. **40**(1 Suppl 1): p. 1-5.
298. Alvarez-Larran A., B. Bellosillo, L. Martinez-Aviles, S. Saumell, A. Salar, E. Abella, *et al.*, *Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients*. Br J Haematol, 2009. **146**(5): p. 504-9.
299. Pieri L., C. Bogani, P. Guglielmelli, M. Zingariello, R.A. Rana, N. Bartalucci, *et al.*, *The JAK2V617 mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera*. Haematologica, 2009. **94**(11): p. 1537-45.
300. Basquiera A.L., N.W. Soria, R. Ryser, M. Salguero, B. Moiraghi, F. Sackmann, *et al.*, *Clinical significance of V617F mutation of the JAK2 gene in patients with chronic myeloproliferative disorders*. Hematology, 2009. **14**(6): p. 323-30.



301. Passamonti F., E. Rumi, D. Pietra, M.G. Della Porta, E. Boveri, C. Pascutto, *et al.*, *Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3676-82.
302. Plo I., M. Nakatake, L. Malivert, J.P. de Villartay, S. Giraudier, J.L. Villeval, *et al.*, *JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1402-12.
303. Zhao R., G.A. Follows, P.A. Beer, L.M. Scott, B.J. Huntly, A.R. Green, *et al.*, *Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2778-89.
304. Asimakopoulos F.A., N.J. White, E. Nacheva and A.R. Green, *Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3086-94.
305. Campbell P.J., E.J. Baxter, P.A. Beer, L.M. Scott, A.J. Bench, B.J. Huntly, *et al.*, *Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3548-55.
306. Kralovics R., S.S. Teo, S. Li, A. Theocharides, A.S. Buser, A. Tichelli, *et al.*, *Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1377-80.
307. Theocharides A., M. Boissinot, F. Girodon, R. Garand, S.S. Teo, E. Lippert, *et al.*, *Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation*. Blood, 2007. **110**(1): p. 375-9.
308. Levine R.L. and D.G. Gilliland, *Myeloproliferative disorders*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2190-8.
309. Tefferi A., *Essential thrombocythemia: scientific advances and current practice*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(2): p. 93-8.
310. Cervantes F., F. Passamonti and G. Barosi, *Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 905-14.
311. Finazzi G., M. Ruggeri, F. Rodeghiero and T. Barbui, *Second malignancies in patients with essential thrombocythaemia treated with busulphan and hydroxyurea: long-term follow-up of a randomized clinical trial*. Br J Haematol, 2000. **110**(3): p. 577-83.
312. Barosi G., A. Ambrosetti, A. Centra, A. Falcone, C. Finelli, P. Foa, *et al.*, *Splenectomy and risk of blast transformation in myelofibrosis with myeloid*

- metaplasia. Italian Cooperative Study Group on Myeloid with Myeloid Metaplasia. Blood, 1998. 91(10): p. 3630-6.*
313. Tefferi A., R.A. Mesa, D.M. Nagorney, G. Schroeder and M.N. Silverstein, *Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. Blood, 2000. 95(7): p. 2226-33.*
  314. Visani G., C. Finelli, U. Castelli, M.C. Petti, P. Ricci, N. Vianelli, *et al.*, *Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. Br J Haematol, 1990. 75(1): p. 4-9.*
  315. Barosi G., C. Berzuini, L.N. Liberato, A. Costa, G. Polino and E. Ascarì, *A prognostic classification of myelofibrosis with myeloid metaplasia. Br J Haematol, 1988. 70(4): p. 397-401.*
  316. Bai J., Y.P. Xue, L. Zhang, C.H. Li, D.M. Fan, B. Li, *et al.*, *Interferon-alpha-2b induces molecular responses of patients with polycythemia vera and its post-polycythemic myelofibrosis. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2011. 19(2): p. 444-9.*
  317. Besses C., A. Alvarez-Larran, L. Martinez-Aviles, S. Mojal, R. Longaron, A. Salar, *et al.*, *Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients. Br J Haematol, 2011. 152(4): p. 413-9.*
  318. Koren-Michowitz M., J. Landman, Y. Cohen, N. Rahimi-Levene, O. Salomon, M. Michael, *et al.*, *JAK2V617 Allele Burden is Associated with Transformation to Myelofibrosis. Leuk Lymphoma, 2012. [Epub ahead of print]*
  319. Kuriakose E., K. Vandrìs, Y.L. Wang, W. Chow, A.V. Jones, P. Christos, *et al.*, *Decrease in JAK2V617F allele burden is not a prerequisite to clinical response in patients with polycythemia vera. Haematologica, 2012. 97(4): p. 538-42.*
  320. Zalcberg IR., Ayres-Silva J., de Azevedo AM., Solza C., Daumas A., Bonamino M., *Hydroxyurea dose impacts hematologic parameters in polycythemia vera and essential thrombocythemia but does not appreciably affect JAK2-V617F allele burden. Haematologica, 2011. 96(3):p.18-20.*
  321. Moliterno A.R., D.M. Williams, O. Rogers, M.A. Isaacs and J.L. Spivak, *Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. Exp Hematol, 2008. 36(11): p. 1480-6.*
  322. Guglielmelli P., G. Barosi, A. Rambaldi, R. Marchioli, A. Masciulli, L. Tozzi, *et al.*, *Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. Blood, 2011. 118(8): p. 2069-76.*
  323. Barosi G., V. Rosti and A.M. Vannucchi, *Therapeutic approaches in myelofibrosis. Expert Opin Pharmacother, 2011. 12(10): p. 1597-611.*

324. Rambaldi A., C.M. Dellacasa, G. Finazzi, A. Carobbio, M.L. Ferrari, P. Guglielmelli, *et al.*, *A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms*. *Br J Haematol*, 2010. **150**(4): p. 446-55.
325. Verstovsek S., H. Kantarjian, R.A. Mesa, A.D. Pardanani, J. Cortes-Franco, D.A. Thomas, *et al.*, *Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(12): p. 1117-27.
326. Tefferi A. and A. Pardanani, *Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis*. *Mayo Clin Proc*, 2011. **86**(12): p. 1188-91.
327. Mesa R.A., *Ruxolitinib, a selective JAK1 and JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis*. *IDrugs*, 2010. **13**(6): p. 394-403.
328. Verstovsek S., R.A. Mesa, J. Gotlib, R.S. Levy, V. Gupta, J.F. DiPersio, *et al.*, *A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(9): p. 799-807.
329. Mesa R.A., U. Yasothan and P. Kirkpatrick, *Ruxolitinib*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(2): p. 103-4.
330. Ostojic A., R. Vrhovac and S. Verstovsek, *Ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis*. *Drugs Today (Barc)*, 2011. **47**(11): p. 817-27.
331. Pardanani A., J.R. Gotlib, C. Jamieson, J.E. Cortes, M. Talpaz, R.M. Stone, *et al.*, *Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(7): p. 789-96.
332. Santos F.P., H.M. Kantarjian, N. Jain, T. Manshouri, D.A. Thomas, G. Garcia-Manero, *et al.*, *Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis*. *Blood*, 2010. **115**(6): p. 1131-6.
333. Tyner J.W., T.G. Bumm, J. Deininger, L. Wood, K.J. Aichberger, M.M. Loriaux, *et al.*, *CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms*. *Blood*, 2010. **115**(25): p. 5232-40.
334. Tefferi A., S. Verstovsek, G. Barosi, F. Passamonti, G.J. Roboz, H. Gisslinger, *et al.*, *Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(27): p. 4563-9.
335. Mesa R.A., A.D. Pardanani, K. Hussein, W. Wu, S. Schwager, M.R. Litzow, *et al.*, *Phase1/-2 study of Pomalidomide in myelofibrosis*. *Am J Hematol*, 2010. **85**(2): p. 129-30.
336. Begna K.H., R.A. Mesa, A. Pardanani, W.J. Hogan, M.R. Litzow, R.F. McClure, *et al.*, *A phase-2 trial of low-dose pomalidomide in myelofibrosis*. *Leukemia*, 2011. **25**(2): p. 301-4.



337. Guglielmelli P., G. Barosi, A. Rambaldi, R. Marchioli, A. Masciulli, L. Tozzi, *et al.*, *Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2069-76.
338. Mascarenhas J., S. Navada, A. Malone, A. Rodriguez, V. Najfeld and R. Hoffman, *Therapeutic options for patients with myelofibrosis in blast phase*. Leuk Res, 2010. **34**(9): p. 1246-9.